Synthese und enzymatischer Abbau von Histidylpeptiden

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Ruff
aus Stuttgart

1964

7942

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0035

Synthese und enzymatischer Abbau von Histidylpeptiden

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Ruff
aus Stuttgart

1964

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1964

Dekan: Professor Dr. P. Roquette

1. Berichterstatter: Professor Dr.Dr. G.Weitzel

2. Berichterstatter: Professor Dr. Ernst Bayer

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Diese Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn

Professor Dr.Dr. Günther Weitzel,

Direktor des Instituts für physiologische Chemie der Universität Tübingen, ausgeführt.

Ich danke meinem Lehrer für die Überlassung des Themas und für die grosszügige Förderung dieser Arbeit.

Ferner möchte ich Herrn Dozenten Dr. Friedhelm Schneider für viele Ratschläge und wertvolle Anregungen danken.

Frau Dr. Anna-Maria Fretzdorff und Fräulein Eva Brintzinger danke ich für die Ausführung der Analysen und Herrn Dr. Werner Schaeg für die Aufnahme der Titrationskurven.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Fragestellung 5

II. Darstellung der Tetrapeptide 7
1. Synthesen 7
2. Freie Peptide 13
3. pK-Werte 14

III. Abbauversuche 15
1. Spaltung durch proteolytische Fermente 15
2. Abbau durch Serum 26
3. Partialhydrolyse durch konzentrierte Salzsäure 30

IV. Beschreibung der Versuche 35

V. Zusammenfassung 61

VI. Literaturverzeichnis 63

I. Einleitung und Fragestellung

Peptidhormone und andere Wirkstoffe aus der Gruppe der Oligo- und Polypeptide sind während ihres Transports in der Blutbahn den Peptidasen des Blutes ausgesetzt, bevor sie ihre Erfolgsorgane erreichen. Die peptidspaltende Aktivität des Blutserums wird dabei entscheidend von der Struktur der Peptidkette beeinflusst. Man kennt Oligopeptide, welche im Blutserum stabil sind, wie z.B. das Glutathion, und andere, welche sehr rasch vom Blutserum zerlegt werden, z.B. das Leucyl-glycyl-leucin. Die Abhängigkeit der biologischen Aktivität eines Peptidwirkstoffs vom Angriff der Peptidasen lässt sich besonders gut am Beispiel des Angiotensins oder Hypertensins[1-4] demonstrieren. Dieses blutdrucksteigernde Dekapeptid wird durch das von der Niere gelieferte Ferment Renin aus dem α_2-Globulin des Blutserums freigesetzt, ohne aber zunächst biologisch wirksam zu sein. Erst durch eine im Blutserum enthaltene Peptidase ("converting enzyme") wird durch Abspaltung des carboxylständigen Histidyl-leucin das hochwirksame Octapeptid Angiotensin II freigesetzt. In dieser stark blutdruckwirksamen Form ist das Peptid jedoch nur wenige Minuten lang beständig, denn nun führen weitere spezifische Peptidasen des Serums, vielleicht auch die noch umstrittene "Angiotensinase"[5], durch weiteren Abbau zum Verlust der Wirkung. Während somit im Falle des Angiotensins ein geregeltes, biologisch erwünschtes Zusammenspiel peptidischer Abbauvorgänge vorliegt, muss für andere Peptidwirkstoffe, z.B. für Insulin, Oxytoxin und Vasopressin angenommen werden, dass diese Wirkstoffe während ihres Transports im Blut vor dem Angriff der Peptidasen geschützt sind. Wie dies geschieht, ist bisher unbekannt.

Um das unterschiedliche Verhalten von Peptidbindungen ge-

genüber Peptidasen genauer erfassen zu können, ist es erforderlich, an synthetischen Modellpeptiden die Zusammenhänge zwischen Kettensequenz und Stabilität der betreffenden Peptidbindungen gegenüber fermentativem Abbau systematisch zu prüfen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zu diesem Zweck Tetrapeptide synthetisiert, deren gemeinsames Kennzeichen der Besitz der Sequenz Gly-his-leu[6] ist. Diese Sequenz wurde deshalb gewählt, weil die Aminosäure Histidin in zahlreichen Peptidwirkstoffen und Fermenten an der biologischen Wirkung beteiligt und dabei auffallend oft mit der Aminosäure Leucin verknüpft ist.

Hält man, wie es in der vorliegenden Arbeit geschieht, in den untersuchten Tetrapeptiden die Sequenz Gly-his-leu konstant, so lässt sich in übersichtlicher Weise der Einfluss einer am Aminoende oder am Carboxylende angefügten vierten Aminosäure auf die Stabilität gegenüber dem Angriff von Peptidasen nachprüfen. Es wurden daher die folgenden Tetrapeptide synthetisiert:

Gly-gly-his-leu (1),	ß-Ala-gly-his-leu (2),
Gly-his-leu-gly (3),	Gly-his-leu-ß-ala (4),
Gly-his-leu-glu (5),	Gly-his-leu-asp (6).

Diese wurden in fermentativen Abbauversuchen verschiedenen Seren sowie den folgenden Enzymen als Substrate angeboten: Trypsin, α-Chymotrypsin, Pepsin, Leucinaminopeptidase, Papain, Ficin und Pronase. Vergleichsweise wurde auch ein Abbau mit konzentrierter Salzsäure durchgeführt.

II. Darstellung der Tetrapeptide[+)]

1. Synthesen

Unter den Methoden zur Knüpfung von Peptidbindungen wurden in erster Linie diejenigen ausgewählt, die zu leicht isolierbaren und reinen Produkten führen, unabhängig von der Ausbeute oder Einfachheit der Methode. Vor allem wurde Wert darauf gelegt, eine Racemisierung bei der Peptidsynthese zu vermeiden.

Die Azidmethode[7)], eine der ältesten Methoden zur Darstellung von Peptiden, hat den Vorteil, dass bei ihrer Durchführung keine Racemisierung auftritt. Sie liefert jedoch im Verhältnis zu anderen Methoden schlechte Ausbeuten; ausserdem treten bei verschiedenen, trifunktionellen Aminosäuren Nebenreaktionen[8)] in erheblichem Ausmasse auf. Man ist bei ihrer Anwendung aufgrund der Unbeständigkeit der geschützten Aminosäureazide gezwungen, bei Temperaturen von -5° bis $0^{\circ}C$ zu arbeiten. Deshalb wird sie nur noch zur Verknüpfung von solchen Aminosäuren verwendet, bei denen die einfacheren Methoden versagen. Dies ist z.B. bei der carboxylendständigen Verknüpfung von Histidin mit Aminosäuren oder Peptidestern der Fall.

Die Methode der gemischten Anhydride[9-11)] ist einfach durchzuführen, Racemisierung ist jedoch auch bei Arbeiten in absol. Lösungsmitteln nicht ganz auszuschliessen. Deshalb wurde sie nur zur Verknüpfung von Cbo-glycin verwendet, da hier keine Racemisierung möglich ist.

Die p-Nitrophenylestermethode[12-14)] führt zu guten Ausbeuten und ist nahezu universell anwendbar. Beim Ar-

---

+) Sämtliche Aminosäuren wurden in der natürlichen L-Form eingesetzt. Der Einfachheit halber wird im folgenden die Bezeichnung - L - weggelassen.

beiten mit schützten Aminosäure-p-nitrophenylestern besteht keine Gefahr einer Racemisierung. Der p-Nitrophenylester von Cbo-histidin ist jedoch aufgrund der durch den Imidazolrest katalysierten, starken Eigenhydrolyse nicht darstellbar. Dadurch kommt diese Methode zur Verknüpfung der Carboxylgruppe des Histidins mit Aminosäure- oder Peptidestern nicht in Frage.

Gegenüber der eleganten Peptidkupplung mit Dicyclohexylcarbodiimid nach SHEEHAN[15] hat die Methode der "aktiven Ester" zwar den Nachteil einer zusätzlichen Synthesestufe, das entstehende p-Nitrophenol lässt sich jedoch, besonders bei schwerer löslichen Peptidderivaten, leichter entfernen als der bei der Sheehan-Methode anfallende Dicyclohexylharnstoff, von dem letzte Reste nur durch mehrmaliges Umkristallisieren des Produktes beseitigt werden können.

Als Aminoschutzgruppe wurde der von BERGMANN und ZERVAS[16] eingeführte Carbobenzoxylrest verwendet. Diese Schutzgruppe ist gegen Alkalien und schwache Säuren unempfindlich. Die Cbo-Aminosäuren und deren Derivate sind gut zu kristallisieren, und bei der Peptidverknüpfung werden die Aminosäuren durch den Cbo-Rest gegen Racemisierung stabilisiert. Von den geschützten Peptiden lässt sich die Cbo-Gruppe durch HBr/Eisessig oder durch katalytische Hydrierung leicht wieder entfernen.

Als Carboxylschutzgruppe wurde die p-Nitrobenzylestergruppe[17] verwendet. Sie lässt sich leicht einführen und erzeugt selbst bei grösseren geschützten Peptiden eine gute Kristallisierbarkeit. Die p-Nitrobenzylester sind gegen HBr/Eisessig weitgehend beständig, so dass die Cbo-Gruppe ohne Schwierigkeiten selektiv abgespalten werden kann. Lediglich von Glutaminsäure und Asparaginsäure wurden die Dibenzylester eingesetzt.

Die Benzyl- sowie die p-Nitrobenzylgruppen haben gegen-

über Methyl- und Äthylestern den Vorteil, dass sie sich katalytisch abhydrieren lassen. Dadurch kann bei der Peptidsynthese die sonst erforderliche Abspaltung durch alkalische Verseifung umgangen werden. Eine alkalische Verseifung musste schon deshalb vermieden werden, da Cbo-peptidester mit Glycin an zweiter Stelle vom Aminoende bei der Verseifung leicht unter Abspaltung von Benzylalkohol in ein Hydantoin-bzw. Harnstoffderivat übergehen[18,19]. Ausserdem ist es sehr schwierig, Cbo-Peptide, die sowohl basische wie auch saure trifunktionelle Aminosäuren enthalten, nach einer Verseifung salzfrei zu erhalten.

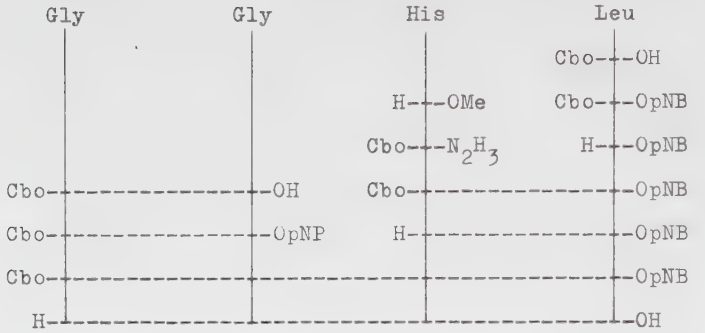
Der Syntheseweg der einzelnen Peptide ist aus den vier gezeigten Reaktionsschemata ersichtlich. Gly-gly-his-leu (1) wurde dabei auf zwei verschiedene Arten hergestellt (Schema 1 u. 2), wobei beide etwa gleichwertig sind. Bei der Synthese nach Schema 1 wurde Cbo-glycyl-glycin aus Diketopiperazin durch halbseitige, alkalische Hydrolyse und anschliessende Carbobenzoxylierung gewonnen.

Die Synthese von Cbo-glycyl-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester (Schema 2) nach der Azidmethode ergab, dass p-Nitrobenzylester bei der Azidsynthese schlechtere Ausbeuten liefern als Methylester[6]. Dieser Nachteil wird jedoch durch den Wegfall einer alkalischen Verseifung weit ausgeglichen.

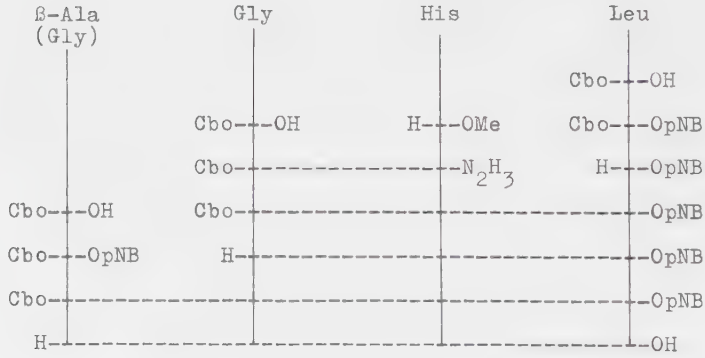
Cbo-glycyl-histidin-azid (Schema 2,3 u. 4) ist in den meisten organ. Lösungsmitteln schwer löslich. Selbst in Chloroform lösen sich nur ca. 4 mMol pro 100 ccm. Grössere Ansätze sind nun aus praktischen Gesichtspunkten erschwert, da die damit verbundenen grossen Lösungsmittelmengen zwischen den einzelnen Arbeitsgängen nicht intensiv und schnell genug gekühlt werden können. Die schlechten Ausbeuten erfordern jedoch grössere Ansätze.

Es wurde nun versucht, bei der Azidmethode im 2-Phasensystem zu arbeiten, d.h., das Azid wurde nicht erst von

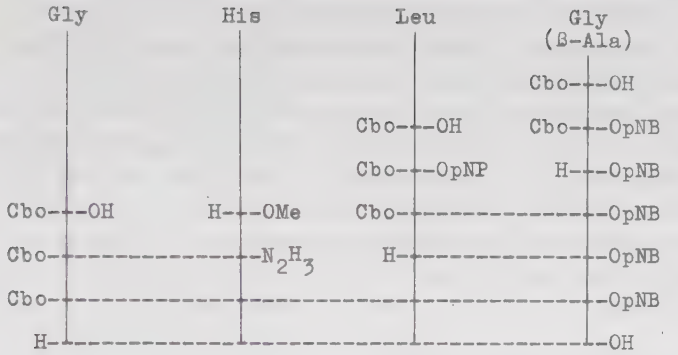
Syntheseschemata



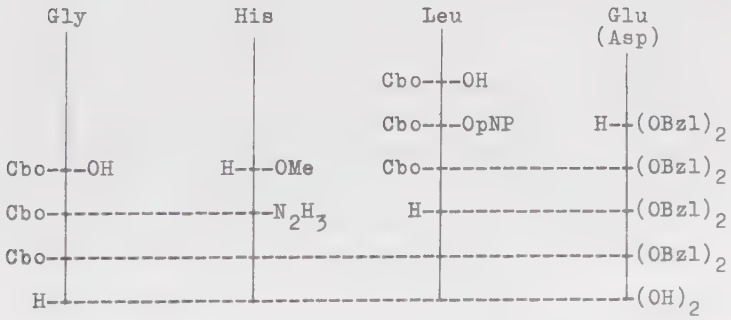
1. Synthese von Gly-gly-his-leu (1)



2. Synthese von Gly-gly-his-leu (1) und ß-Ala-gly-his-leu (2)



3. Synthese von Gly-his-leu-gly (3) und Gly-his-leu-ß-ala (4)



4. Synthese von
Gly-his-leu-glu (5) und Gly-his-leu-asp (6)

Cbo = Carbobenzoxy, OBzl = Benzylester, OMe = Methylester, OpNB = p-Nitrobenzylester, N_2H_3 = Hydrazid, OpNP = p-Nitrophenylester.

der wässrigen Phase abgetrennt, sondern im Reaktionsgefäss belassen und direkt mit der den Aminosäure- bzw. Peptidester enthaltenden Chloroformlösung versetzt und unter Kühlung heftig durchgewirbelt. Dabei zeigte es sich, dass die entstandenen geschützten Tri- und Tetrapeptide in nassem Chloroform schwerlöslich sind und bei dieser Methode direkt kristallin anfallen, was die Isolierung und weitere Reinigung wesentlich erleichtert. Die Ausbeute ist bei dieser Methode nicht schlechter, wie anhand der Synthese von Cbo-glycyl-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester nach beiden Arten festgestellt wurde.

p-Nitrobenzylester sind bekanntlich gegenüber HBr/Eisessig beständiger als Benzylester, Besonders empfindlich sind die Dibenzylester von Glutaminsäure und Asparaginsäure. Nach 15 Min. langer Einwirkung von 30proz. HBr/Eisessig auf Cbo-glutaminsäure-dibenzylester[20] erhält man nur 42 % an Diester, während 41 % Monoester und bereits 17 % freie Glutaminsäure gebildet werden. Bei Cbo-leucyl-glutaminsäure-dibenzylester (Schema 4) wurde daher die Einwirkung von HBr/Eisessig schon nach 10 Min. durch Zugabe eines Überschusses an Kaliumcarbonat gestoppt. So konnte der Leucyl-glutaminsäure-dibenzylester immerhin mit 57proz. Ausbeute gewonnen werden. Der entsprechende Asparaginsäureester ist etwas stabiler.

Sämtliche geschützten Tetrapeptide liessen sich gut aus Pyridin/Wasser umkristallisieren, so dass sie in analysenreiner Form zur Hydrierung eingesetzt werden konnten. Zuvor wurden Proben der geschützten Peptide bei 120°C mit konzentrierter Salzsäure hydrolysiert und aus dem Hydrolysat die zu erwartenden Aminosäuren papierchromatographisch nachgewiesen. Bei Cbo-glycyl-glycyl-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester sowie bei Cbo-glycyl-histidyl-leucyl-glycin-p-nitrobenzylester war der Glycin-Fleck deutlich stärker als die anderen

Flecken, so dass die Anwesenheit von 2 Glycinresten in diesen Verbindungen als gesichert gelten konnte.

Die Hydrierung der geschützten Peptide und die Reinigung der freien Peptide wurde ausser bei Peptid 3 ohne Zusatz von sauren oder basischen Lösungsmitteln durchgeführt. Normalerweise wird die katalytische Hydrierung in Methanol/Eisessig durchgeführt. Basische Peptide enthalten dann jedoch uneinheitliche Mengen an Essigsäure, die sich auch durch Umfällen oder Trocknen über KOH nicht vollständig entfernen lassen. Daher wurde Dimethylformamid oder erwärmtes Methanol als Lösungsmittel verwendet. Die Wasserstoffaufnahme erfolgt dann jedoch wesentlich langsamer, und die im Laufe der Hydrierung ausfallenden Peptide müssen durch Wasserzugabe wieder gelöst werden. Sämtliche Peptide konnten durch Umfällen und Umkristallisieren gereinigt werden, wobei mit Ausnahme von Peptid 6 alle in kristalliner Form erhalten wurden.

2. Freie Peptide

Die freien Peptide sind ausser Peptid 5 gut im Wasser löslich. In frisch angesetztem Blutanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) und Pyridin/Wasser (65:35) zeigen sie bei aufsteigender Chromatographie folgende R_f-Werte, die aus Gründen der Reproduzierbarkeit auf Leucin bezogen wurden (R_{Leu}-Werte):

Tab. 1: R_{Leu}-Werte der freien Histidylpeptide (R_f Leu=1; I: Butanol/Eisessig/Wasser, II: Pyridin/Wasser)

	I	II
Gly-gly-his-leu (1)	0,52	0,95
ß-Ala-gly-his-leu (2)	0,56	0,98
Gly-his-leu-gly (3)	0,49	0,98
Gly-his-leu-ß-ala (4)	0,56	1,01
Gly-his-leu-glu (5)	0,53	0,88
Gly-his-leu-asp (6)	0,43	0,86

In Phosphatpuffer gelöst, zeigen die Peptide bei der Chromatographie in Butanol/Eisessig/Wasser zwei Flekken. Der neu auftretende Fleck hat dabei einen wesentlich kleineren R_f-Wert. Seine Farbintensität nimmt mit steigendem pH-Wert des Phosphatpuffers auf Kosten des ohne Phosphatpuffer alleine vorliegenden, normalen Flekkes zu. Dies ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Salzbildung zurückzuführen.

3. Bestimmung der pK-Werte

Zum Nachweis der in den Peptiden vorhandenen basischen und sauren Gruppen sowie zur Prüfung auf Reinheit wurden die in Form der Hydrochloride vorliegenden Peptide mit Kalilauge potentionmetrisch titriert. Dabei wurden folgende pK-Werte erhalten:

Tab. 2:

Peptid	pK-NH_2	pK $N^{\leq}$	pK γ-COOH
Gly-gly-his-leu (1)	8,02	6,61	-
ß-Ala-gly-his-leu (2)	9,20	6,65	-
Gly-his-leu-gly (3)	7,98	6,62	-
Gly-his-leu-ß-ala (4)	8,06	6,61	-
Gly-his-leu-glu (5)	8,17	6,61	4,52
Gly-his-leu-asp (6)	8,18	6,59	4,34

Die Basizität des Imidazolstickstoffs ist bei allen Peptiden gegenüber Histidin um ca. 0,5 Einheiten erhöht. Dies stimmt mit pK-Messungen anderer Peptide mit mittelständigem Histidin überein[18,21]. Die α-NH_2-Gruppen des aminoendständigen Glycins sind in ihrer Basizität gegenüber freiem Glycin oder Glycyl-glycin (9,78 und 8,25)[22] erniedrigt. Dies lässt sich durch die Zunahme des Abstandes der funktionellen Gruppen und die damit verbundene Abnahme des Feldeffektes erklären. Durch die zusätzliche Carboxylgruppe bei Gly-his-leu-glu und Gly-his-leu-asp wird die Abnahme des Feldeffektes z.T. wieder kompensiert, so dass der pK-Wert der α-NH_2-Gruppe bei

diesen Peptiden dem eines Dipeptides mit aminoendständigem Glycin nahekommt (Gly-his:8,2)[21]. Die Basizität der ß-Aminogruppe von ß-Ala-gly-his-leu ist erwartungsgemäss höher als die einer α-Aminogruppe, was auf die Abschirmung durch die zusätzliche Methylengruppe zurückzuführen ist. Die pK-Werte der γ-COOH-Gruppe von Gly-his-leu-glu und Gly-his-leu-asp sind gegenüber den freien Aminosäuren erhöht. Der niedrigere pK-Wert der Asparaginsäure gegenüber der γ-COOH-Gruppe der Glutaminsäure macht sich auch bei den Peptiden bemerkbar.

Die Einführung von sauren oder etwas stärker basischen Aminosäuren in ein Tetrapeptid mit mittelständigem Histidin hat demnach über eine zweite, neutrale Aminosäure hinweg praktisch keinen Einfluss auf den pK N^{π} -Wert des Imidazolringes.

III. Abbauversuche

1. Spaltung durch proteolytische Fermente

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen ungeschützten Peptide wurden zunächst der Einwirkung der Verdauungsenzyme Trypsin, α-Chymotrypsin und Pepsin ausgesetzt. Die Spezifität dieser Enzyme ist zwar weitgehend erforscht[23], doch treten immer wieder unerwartete Spaltungseffekte auf. Die eingesetzten Peptide blieben jedoch selbst nach 20 Stdn. völlig unangegriffen.

Leucinaminopeptidase

Als nächstes proteolytisches Ferment wurde die nicht nur im Verdauungstrakt, sondern auch im Serum des tierischen Organismus vorkommende Leucinaminopeptidase eingesetzt. Diese Peptidase, die später als andere Proteasen in die Proteinchemie eingeführt wurde[24], hydrolysiert eine Vielzahl von Peptiden mit freier Aminogruppe. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die abzuspaltende Aminosäure in der L-Konfiguration vorliegt und die Aminogruppe

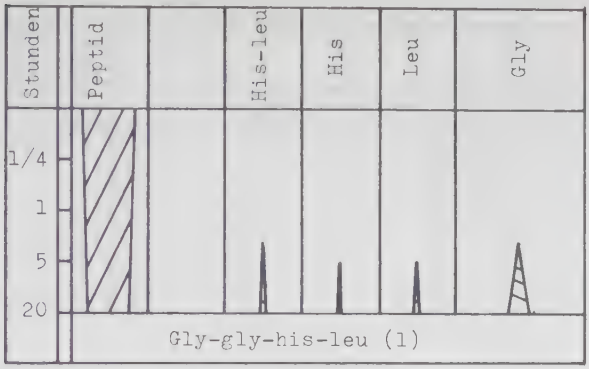
in α-Stellung verknüpft ist. Ihre Spezifität ist nicht, wie ihr Name vermuten lässt, auf Leucinpeptide beschränkt; die Geschwindigkeit, mit der die einzelnen Bindungen gespalten werden, zeigt jedoch Unterschiede bis zu drei Zehnerpotenzen ($K_{rel.}$ Leucinamid: 100 gegenüber Glycinamid: 0,1)[25]. Die Hydrolysengeschwindigkeit bei den einzelnen Substraten hängt weitgehend von der Grösse und Polarität der Seitenkette der abzuspaltenden Aminosäure ab. Dabei ergibt sich etwa folgende Reihe: Leu > Val > Ala > Gly[26]. Aber auch die Seitenkette der darauffolgenden Aminosäure hat einen gewissen Einfluss, und zwar je nach Polarität, wobei die Geschwindigkeit von Gly-leu-NH_2 über Gly-leu und Gly-try bis Gly-tyr abnimmt. HANSON und SMITH[27] konnten zeigen, dass bei Peptiden mit aminoendständigen ß-Aminosäuren keine Spaltung eintritt. Hat jedoch die darauffolgende Aminosäure die Aminogruppe am ß-Kohlenstoffatom, dann hat dies auf die Spaltbarkeit der Peptidbindung keinen hemmenden Einfluss ($K_{rel.}$ Leu-ala: 64; $K_{rel.}$ Leu-ß-ala: 96). Ähnlich liegt der Fall bei D-Aminosäuren. Liegen sie am Aminoende des Peptides, dann erfolgt keine Spaltung. Hat die vom Aminoende aus gesehen zweite Aminosäure D-Konfiguration, dann findet eine Hydrolyse statt, deren Geschwindigkeit jedoch wesentlich geringer ist als bei Vorliegen der L-Konfiguration ($K_{rel.}$ Leu-leu: 100, $K_{rel.}$ Leu-D-leu: 0,7)[28].

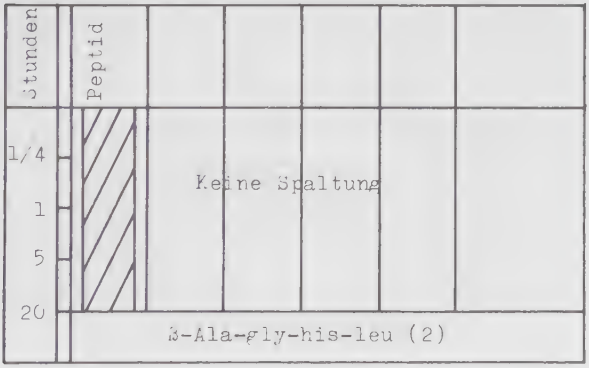
Beim Übergang von Dipeptiden zu entsprechenden Tripeptiden findet im allgemeinen eine Zunahme der Hydrolysengeschwindigkeit statt ($K_{rel.}$ Leu-gly: 86; $K_{rel.}$ Leu-gly-gly: 120). Demnach ist zu erwarten, dass auch beim Übergang von Tri-zu Tetrapeptiden eine gewisse Zunahme erfolgt.

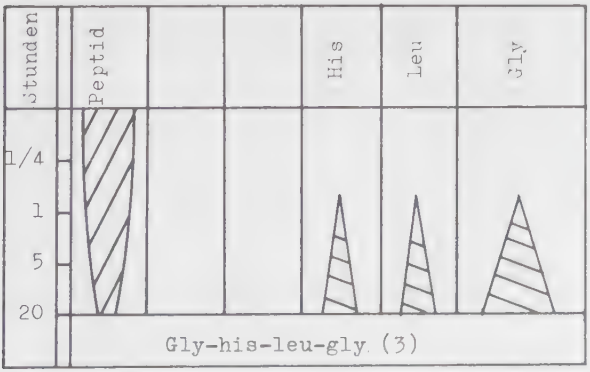
Die Ergebnisse der Einwirkung von Leucinaminopeptidase auf die eingesetzten Tetrapeptide werden durch die folgenden Keildiagramme nach ZAHN und ZIEGLER[29] wiedergegeben. Aus der Länge und Breite der Keile ist ersicht-

Einwirkung von Leucinaminopeptidase

auf:

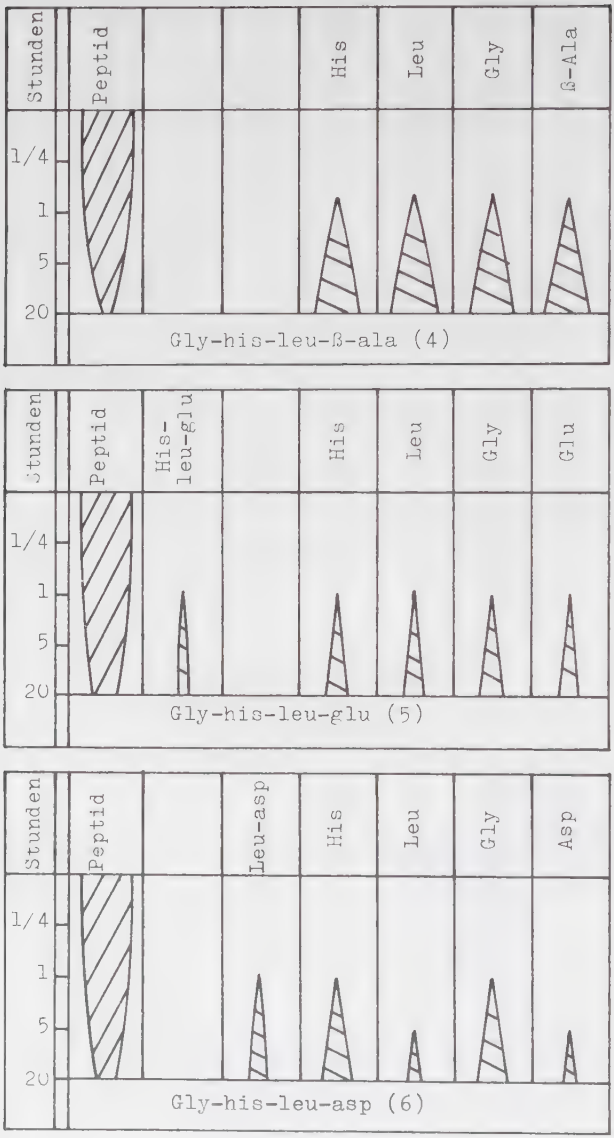






Einwirkung von Leucinaminopeptidase

auf:



lich, nach welchen Zeiten und mit welcher Intensität die einzelnen Spaltstücke papierchromatographisch nachgewiesen werden können.

Erstaunlich ist, dass als Spaltstücke nur selten Tri- und Dipeptide auftreten. Daraus ist abzuleiten, dass die nach Abspaltung der aminoendständigen Aminosäuren freiwerdenden Peptide sofort weitergespalten werden und somit eine geringere Stabilität besitzen als das Tetrapeptid. Lediglich bei Peptid 6 tritt Leu-asp als Peptidbruchstück in grösseren Mengen auf. Die Stabilität eines Peptides gegenüber Leucinaminopeptidase hängt also, wie zu erwarten war, in erster Linie von der Art der, vom Aminoende aus gesehen, ersten Peptidbindung ab. So wird ß-Ala-gly-his-leu überhaupt nicht und Gly-gly-his-leu nur wenig angegriffen, während die übrigen Peptide, die am Aminoende mit der Folge Gly-his beginnen wesentlich stärker abgebaut werden. Unter diesen Peptiden bestehen jedoch hinsichtlich der Stabilität beträchtliche Unterschiede, die nur durch die verschiedenen carboxylendständigen Aminosäuren bedingt sein können. Im Vergleich zur Stabilität von Gly-his-leu[30] ergibt sich bei den Peptiden 3 - 6 folgendes: Am Carboxylende von Gly-his-leu zusätzlich verknüpftes ß-Alanin erleichtert die Spaltung der Gly-his-Bindung. Glycin hat wenig Einfluss, während Glutaminsäure und Asparaginsäure die Spaltbarkeit, auch über eine Entfernung von zwei Aminosäuren hinweg, vermindern.

Papain und Ficin

Papain und Ficin, beides pflanzliche Enzyme, sind in ihren Eigenschaften sehr ähnlich[31]. Beide sind SH-Enzyme und müssen daher mit Cystein reduziert und durch Zusatz von Komplexon vor Schwermetallkationen geschützt werden. Sie zählen zwar zu den Endopeptidasen, doch spalten sie kleinere Peptide auch vom Amino-oder Carboxylende her[32]. Im Vergleich zu anderen Endopeptidasen, wie z.B.

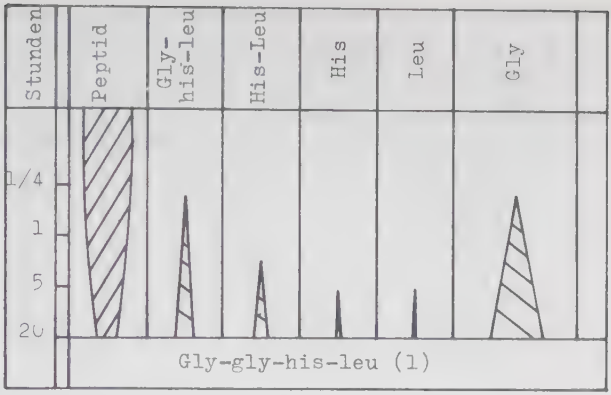
Pepsin oder Trypsin, sind sie wesentlich agressiver. Nach Papainverdauung von kristallinem Eieralbumin brachte weder Pepsin noch Trypsin eine weitere Spaltung, umgekehrt findet jedoch nach Verdauung von Trypsin oder Pepsin durch Einwirkung von Papain noch ein beträchtlicher Abbau statt[33]. Die Aktivität von Papain und Ficin gegenüber Peptiden ist wenig spezifisch. Sie besitzen jedoch Stereospezifität gegenüber der L-Konfiguration. Dipeptide werden, wenn überhaupt, nur langsam gespalten. Fügt man an ein bestimmtes Dipeptid noch eine weitere Aminosäure an, so steigt die Spaltungsgeschwindigkeit oft um ca. eine Zehnerpotenz an. Es kann dabei jedoch nicht vorausgesagt werden, ob die Spaltung an der bereits vorher vorhandenen oder an der neugeknüpften Bindung stattfindet.

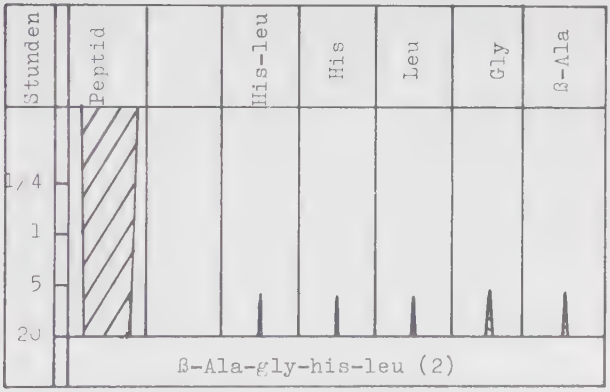
Bei den Abbauversuchen ergab sich, dass Papain und Ficin die einzelnen Peptide jeweils an den gleichen Bindungen spalten, Ficin jedoch agressiver ist. So wird Gly-his-leu-ß-ala von Ficin innerhalb von 20 Stdn. zu etwa 40 % gespalten, während es von Papain nur zu ca. 20 % gespalten wird. Dass ß-Ala-gly-his-leu praktisch nicht angegriffen wird, während Gly-gly-his-leu zu ca. 2/3 gespalten wird, zeigt, dass aminoendständiges ß-Alanin auch vor dem Angriff von Fermenten schützen kann, die keine spezifischen Aminopeptidasen sind.

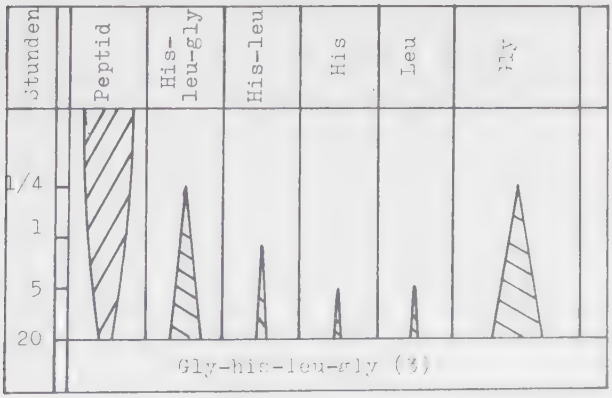
Die vier Peptide, die am Carboxylende der Sequenz Gly-his-leu noch je eine weitere Aminosäure tragen, zeigen untereinander eine interessante Abstufung. Während das Grundpeptid Gly-his-leu[30] praktisch überhaupt nicht angegriffen wird, wird die Spaltbarkeit durch Vergrösserung zum Tetrapeptid beträchtlich gesteigert, und zwar in der Reihenfolge der Aminosäuren Asp < ß-Ala < Glu < Gly. Der Angriff erfolgt dabei jeweils an der ersten Bindung vom Aminoende aus. Der Einfluss dieser vier carboxylendständigen Aminosäuren auf die Spaltbarkeit der Peptide erfolgt hier in ähnlicher Reihenfolge (ß-Ala und Glu vertauscht) jedoch in umgekehrter Richtung wie bei der

Einwirkung von Papain

auf:

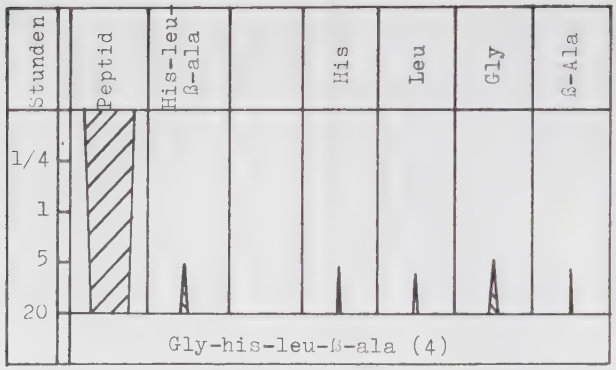


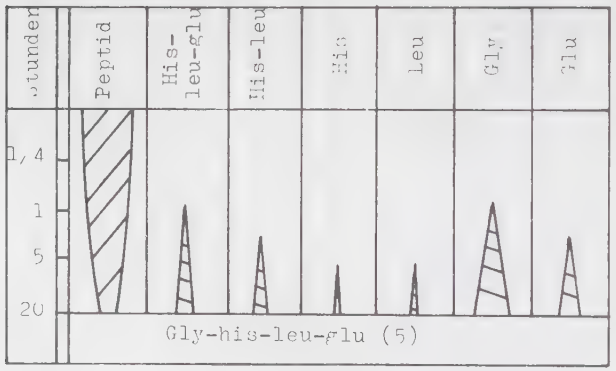


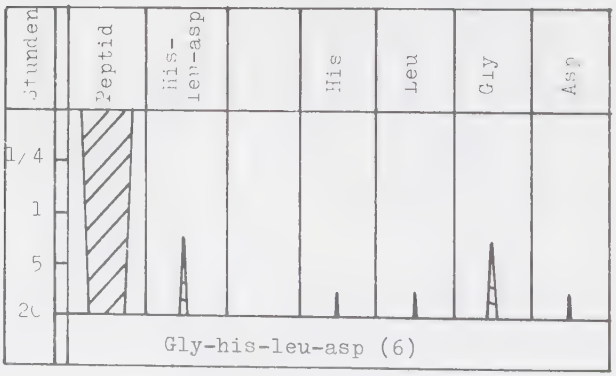


Einwirkung von Papain

auf:







sauren Partialhydrolyse. Dies deutet auf eine abnehmende Aktivität der Enzyme bei steigender Polarität der Peptide hin. Da der Angriff durch Ficin grundsätzlich gleichartig erfolgt wie bei Papain, wird auf die Wiedergabe der Ergebnisse durch Keildiagramme verzichtet.

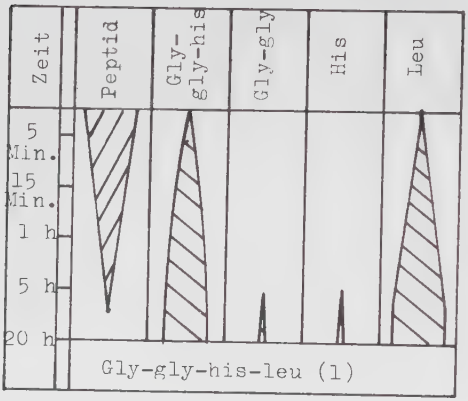
Pronase

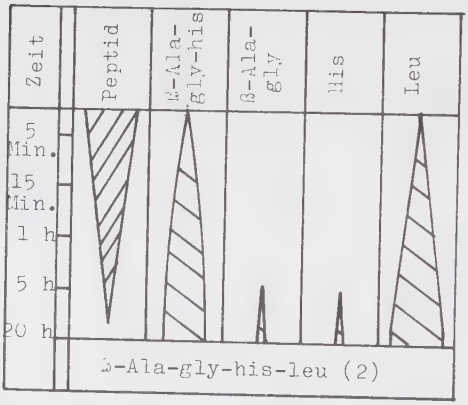
Pronase[34], eine Protease aus Streptomyces griseus, hat gegenüber anderen Proteasen aussergewöhnliche Eigenschaften. Sie ist in einem weiten Temperaturbereich (35-60°C) aktiv und spaltet neben Aminosäureamiden und Aminosäureestern auch Ester von organischen Säuren. Erstaunlich ist, dass die meisten Bindungen ausserordentlich rasch gespalten werden. Das Enzym besitzt eine sehr geringe Spezifität[35]; es wirkt sowohl als Endo- wie auch als Exopeptidase und hydrolysiert bei Proteinen über 80 % der Bindungen.

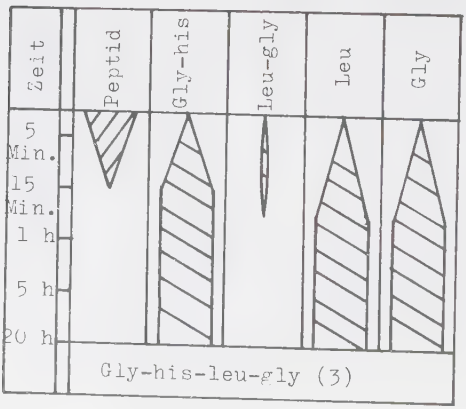
Dies ist jedoch bei den vorliegenden Tetrapeptiden nicht der Fall. Die Bindungen Gly-gly, ß-Ala-gly, sowie Gly-his werden durch Pronase nicht oder nur sehr langsam gespalten. Dementsprechend treten bei der Spaltung der Peptide die Bruchstücke Gly-gly-his, ß-Ala-gly-his und Gly-his auf. Die restlichen Bindungen werden jedoch z.T. so schnell gelöst, dass einzelne Peptide nach kurzer Einwirkungsdauer nur noch in Spuren nachweisbar sind. Bei Peptid 4 kann dabei nicht mehr festgestellt werden, an welcher Bindung der Angriff zuerst erfolgt. Als Spaltprodukte treten nur Gly-his, Leu und ß-Ala auf. Bei den anderen Peptiden erfolgt die Spaltung zuerst zwischen Histidin und Leucin. Das Leucindipeptid ist einige Zeit lang nachweisbar und wird dann mehr oder weniger schnell in seine Bestandteile zerlegt. Auch hier zeigen die Peptide eine gewisse Abstufung in der Angreifbarkeit. Die Stabilität nimmt dabei in der Reihenfolge der Peptide 3, 4, 5, 6, 1, 2 zu. Bei den Peptiden 3 - 6 ist eine Umkehr

Einwirkung von Pronase

auf:

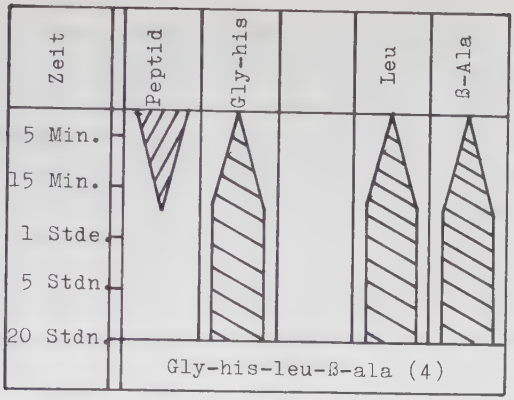


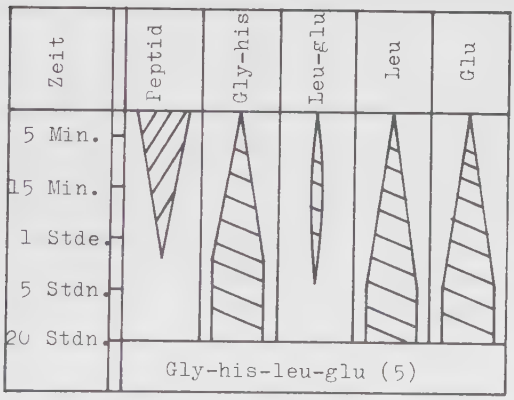


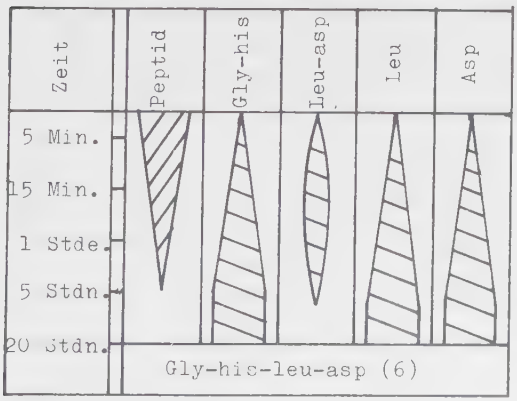


Einwirkung von Pronase

auf:







zu der Stabilität gegenüber 1On HCl und eine gewisse Ähnlichkeit zum Verhalten gegenüber Papain und Ficin zu beobachten.

His-leu und auch Gly-his-leu werden durch Pronase innerhalb von 20 Stdn. zu weniger als 50 % gespalten[30]. Da die Peptide 3 - 6, bei denen Pronase ebenfalls an der Bindung zwischen Histidin und Leucin angreift, vollständig gespalten werden, ergibt sich, dass das Enzym Tetrapeptide leichter spaltet als Di- und Tripeptide. Man kann dies aber auch so auffassen, dass Pronase mehr die Eigenschaften einer Endopetidase als die einer Carboxypeptidase hat.

2. Serum

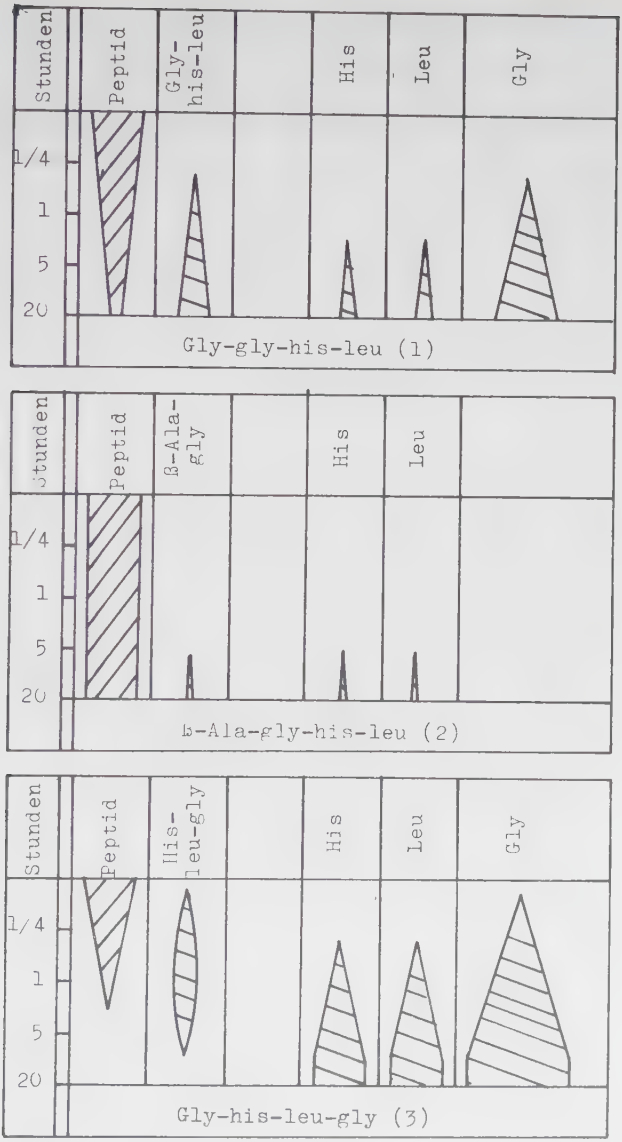
Blutserum[36] sowie Erythrozyten[37] und Leukozyten[38] enthalten ausser Leucinaminopeptidase[39,40] eine bisher noch nicht genau bekannte Anzahl an Di-und Tripeptidasen[41,42]. Dies wurde dadurch festgestellt, dass die einzelnen Enzyme durch verschiedene Metalle aktiviert werden, und das Serum gegenüber einem bestimmten Substrat in Abhängigkeit vom pH-Wert verschiedene Aktivitätsmaxima aufweist.

Diesen Peptidasen sind die Peptidhormone, die über die Blutbahn zum Erfolgsorgan gelangen, ausgesetzt. Dabei ist heute noch weitgehend ungeklärt, ob und in welchem Ausmasse die einzelnen Hormone in vivo gespalten werden. Wird ein Peptidwirkstoff angegriffen, dann betrifft die Spaltung entweder nur die Aminosäuren, die mit der Wirkung direkt nichts zutun haben, oder er wird weitgehend gespalten und es gelangt nur ein gewisser Bruchteil der ausgeschütteten Hormone zum Erfolgsorgan. Da sich bei bestimmten Krankheiten das Enzymverhältnis im Serum ändert[40,41,43], wäre bei der zweiten Möglichkeit mit der Änderung der enzymatischen Aktivität auch eine unterschiedliche Spaltung der Hormone zu erwarten.

Als Beitrag dazu wurden die dargestellten Peptide der Einwirkung von Kaninchenserum ausgesetzt. Die dabei auf-

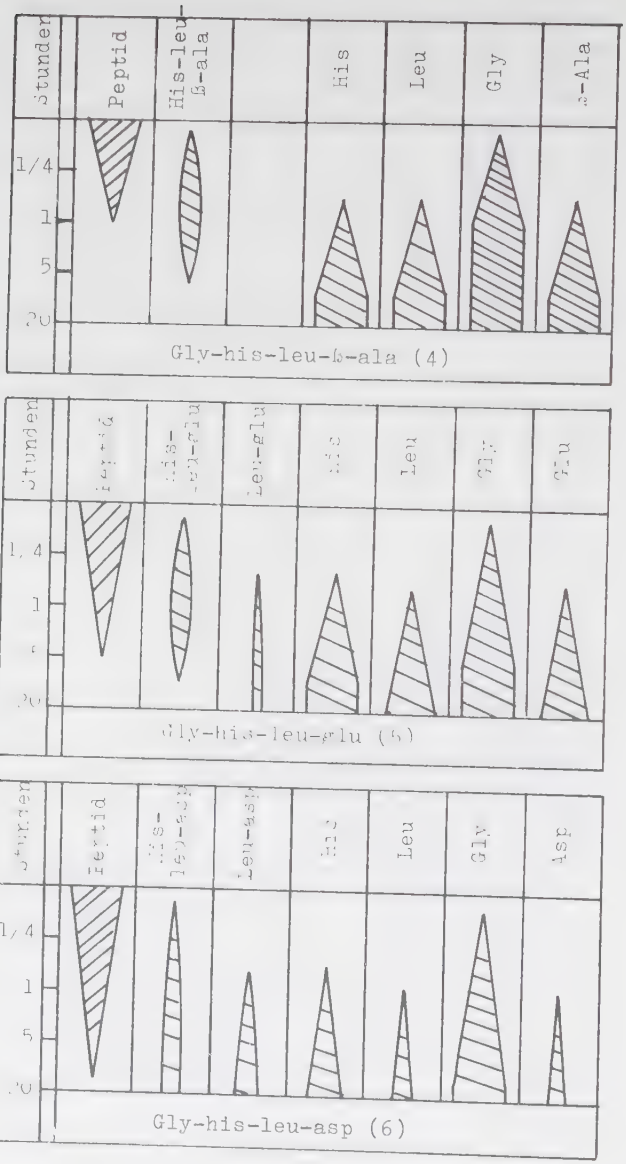
Einwirkung von Humanserum

auf:



Einwirkung von Humanserum

auf:



tretende Spaltwirkung war im Vergleich zur Wirkung von isolierter Leucin-aminopeptidase so stark, dass zunächst eine mögliche Aktivierung durch Berührung des Serums mit Glas oder Metall sowie eine evtl. Freisetzung von neu auftretenden Peptidasen durch den Gerinnungsvorgang ausgeschlossen werden musste. Deshalb wurden die Versuche mit Humanserum, das nur mit Kunststoffgefässen in Berührung kam, sowie mit Citratplasma wiederholt. Es ergaben sich jedoch zwischen den drei Abbauversuchen keine erheblichen Unterschiede, nur Citratplasma zeigte eine etwas geringere Wirkung. Eigentlich hätte Citratplasma allein schon durch die Komplexbildung mit den im Serum vorhandenen Metallionen eine stärkere Inaktivierung der Peptidasen aufweisen müssen.

Peptid 2 wurde nur in Spuren, und zwar vom Carboxylende her angegriffen. Das Gly-gly-Peptid 1 war, wie bei Leucinaminopeptidase, wesentlich stabiler als die Peptide 3 - 6, deren Abstufung in der Spaltbarkeit durch Serum ebenfalls der durch das Enzym entspricht.

Im Gegensatz zum Abbau mit Leucinaminopeptidase traten diesmal jedoch, ausser bei Peptid 2, die entsprechenden Tripeptide auf, d.h., die Gly-his-bindung der Tetrapeptide 3 - 6 wird durch Serum leichter gespalten als die His-leu-bindung der entstandenen Tripeptide.

Wenn die ausser Leucinaminopeptidase im Serum vorhandenen Di-und Tripeptidasen als für Di-und Tripeptide spezifisch anzusehen sind, wäre eigentlich zu erwarten, dass Di-und Tripeptide schneller als Tetrapeptide gespalten werden und somit auch beim Abbau der Tetrapeptide nicht nachweisbar sein dürften. Aus den erhaltenen Ergebnissen muss deshalb gefolgert werden, dass die Di- und Tripeptidasen auch grössere Peptide spalten können, oder aber, dass noch weitere Aminopeptidasen im Serum vorhanden sind, welche auch grössere Peptide spalten. Aus den Abbauversuchen ergibt sich weiterhin, dass ausser aminoendständigem ß-Alanin und Glycyl-glycin auch

carboxylendständige Asparaginsäure einen gewissen Schutz vor dem Abbau durch Serum bietet.

Da sich die Ergebnisse von Humanserum, Kaninchenserum sowie von Citratplasma im wesentlichen gleichen, werden nur die von Humanserum in Form von Keildiagrammen wiedergegeben.

3.) Partialhydrolyse mit konzentrierter Salzsäure

Die saure Hydrolyse spielt bei der Aufklärung von Proteinen eine grosse Rolle. So kann durch die Totalhydrolyse von Eiweisskörpern deren Aminosäurezusammensetzung festgestellt werden. Wichtiger ist jedoch die Partialhydrolyse. Bei ihrer schonenden Durchführung erhält man, ähnlich wie beim enzymatischen Abbau, definierte Bruchstücke, bei denen die weitere Spaltung nur noch langsam erfolgt oder nahezu ganz zum Stillstand kommt. HEINS und KONIGSDORF[44)] fanden beim Abbau von Gelatine unter milden Bedingungen, dass die Säurespaltung bei Proteinen hauptsächlich in der Mitte, und zwar bevorzugt am Aminoende von Aminodicarbonsäuren, Oxyaminosäuren, Alanin und Glycin erfolgt.

Um den Mechanismus der Säurespaltung und den Einfluss von Seitenketten auf die Spaltbarkeit der Peptidbindung aufzuklären, wurden viele Untersuchungen an Dipeptiden und einfachen Oligo-und Polypeptiden durchgeführt[45-49)]. Einfache Tripeptide, wie Diglycyl-glycin oder Leucyl-glycyl-leucin[50)] spalten die aminoendständige Aminosäure wesentlich schwerer ab als die carboxylendständige. Dies ist durch den einen Angriff von Protonen auf die aminoendständige Peptidbindung stark hindernden, induktiven Effekt der protonisierten Aminogruppe bedingt. Andererseits spielen sterische Behinderung durch Seitengruppen bei der Peptidspaltung eine grosse Rolle[51)]. So wird z.B. Leucyl-glycin wesentlich schwerer gespalten als Glycyl-leucin. Der t-Butylrest des Leucins hat demnach auf die Spaltung an seinem Carboxylende einen stärkeren

Einfluss als am Aminoende.

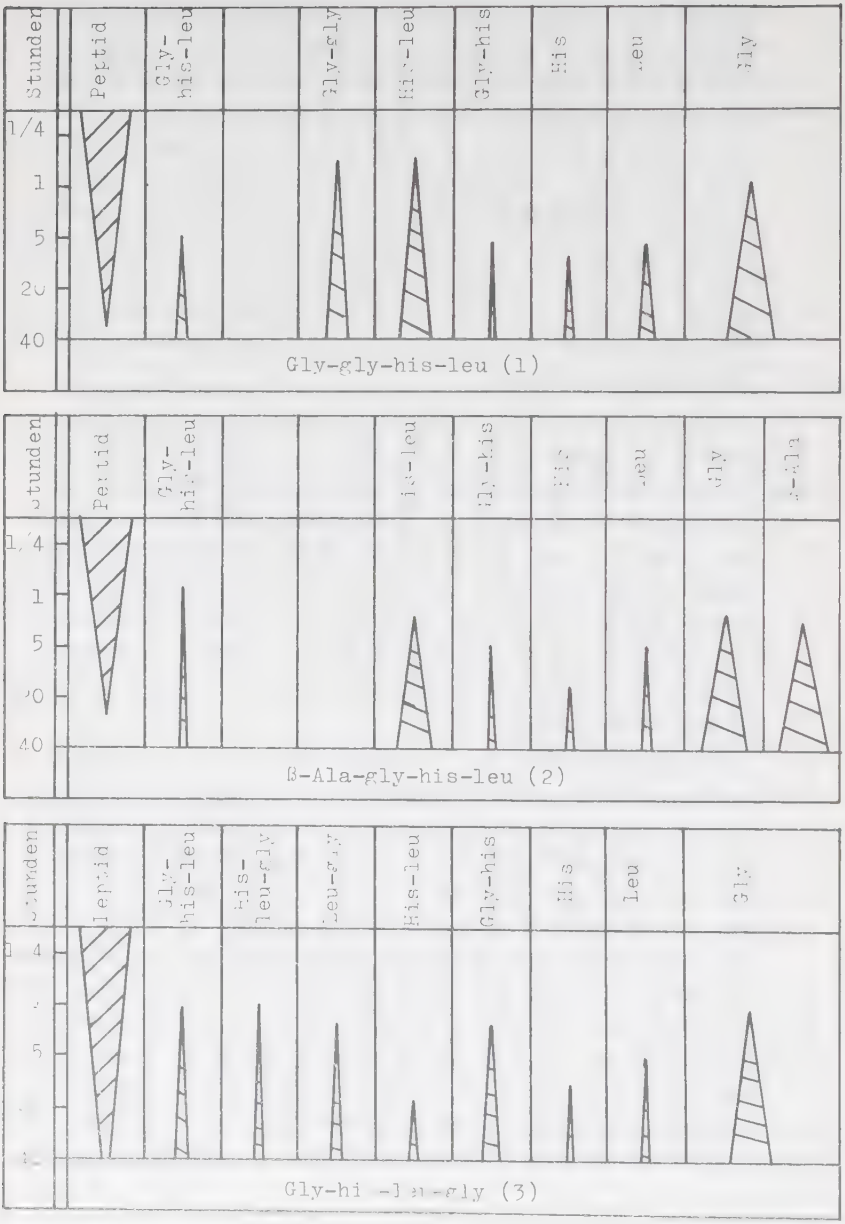
Ausser der Behinderung durch Seitenketten besteht bei einer Reihe von Aminosäuren eine Begünstigung der hydrolytischen Spaltung. DESNUELLE u. G. BONJOUR[52] fanden bei der Spaltung von Acetylaminosäuren (0,25 m Oxalsäure bei 105°C) eine Abnahme der Bindekräfte in Richtung Acyl-gly, Acyl-ß-ala, Acyl-glu, Acyl-asp. Freie Carboxylgruppen begünstigen also die Hydrolyse von Peptidbindungen; ihre Wirksamkeit variiert je nach der Stellung ($\beta > \alpha > \gamma$). Die Begünstigung des Angriffs ist z.T. so stark, dassbei Gly-glu-gly[53] trotz der Behinderung durch die protonisierte Aminogruppe das aminoendständige Glycin abgespalten wird.

Aufgrund dieser Erfahrungen lassen sich für die Spaltung von Di-und Tripeptiden wie auch für die Stabilität der Bindungen von Polypeptiden gewisse Voraussagen machen. Tetra-und Pentapeptide nehmen jedoch eine Mittelstellung ein. Bei ihnen können sich die einzelnen, gegeneinander wirkenden Effekte, je nach Aminosäuresequenz, wieder aufheben. Da die Spaltung von etwas komplizierteren Peptiden durch partielle Säurehydrolyse bisher noch wenig untersucht ist, wurde sie an den dargestellten Peptiden durchgeführt.

Dabei ergab sich, dass die Tetrapeptide zwar relativ langsam, aber an allen Bindungen gleichzeitig hydrolysiert werden. Es treten nahezu alle in Frage kommenden Spaltstücke auf. Der Angriff erfolgt jedoch, unabhängig von der Art der Bindung hauptsächlich in der Mitte der Peptide, und zwar bei Peptid 1 u. 2 am Aminoende und bei den Peptiden 3 - 6 am Carboxylende von Histidin. Dies ist erstaunlich, denn basische Aminosäuren schützen die nächsten Bindungen im allgemeinen vor einer Säurehydrolyse, da sie in saurem Milieu ja bereits schon in protonisierter Form vorliegen. Die endständigen Bindungen wurden in geringerem Masse gespalten, wobei zwischen Amino-und Carb-

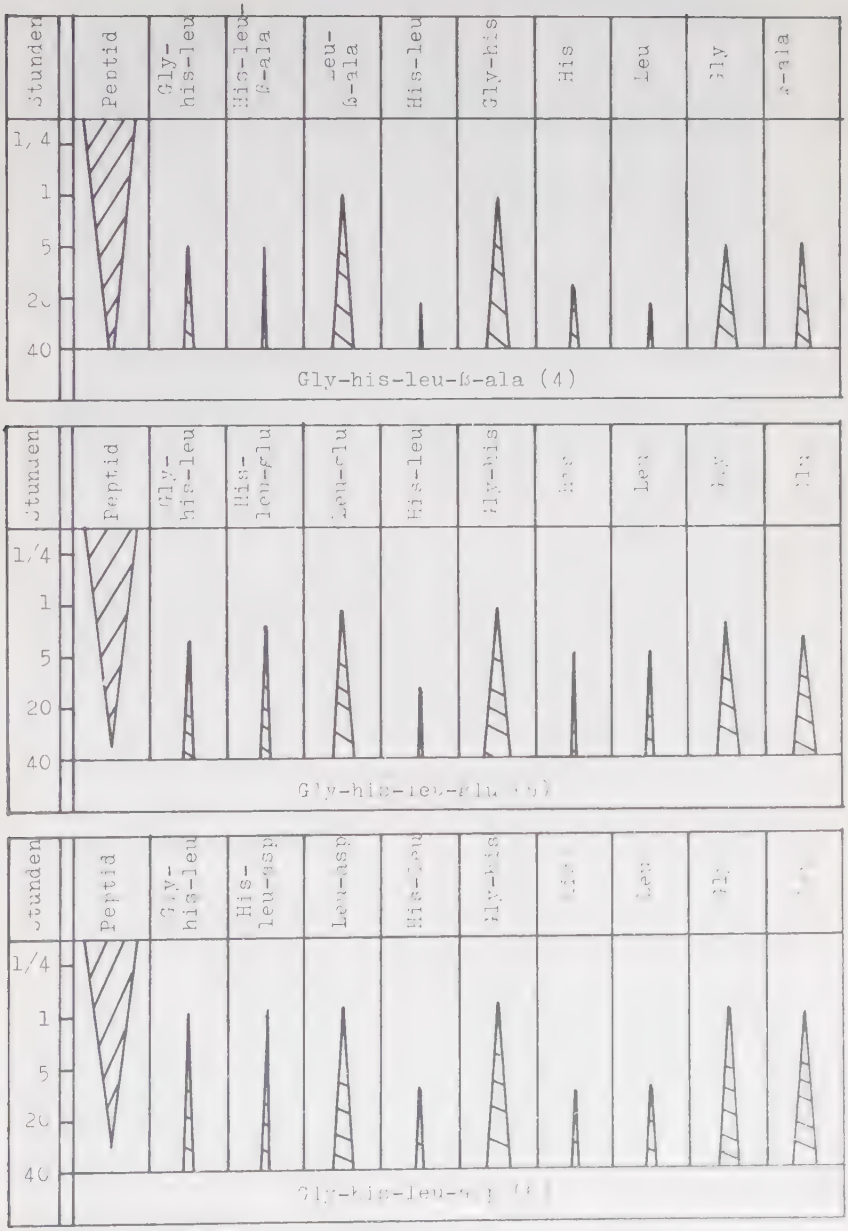
Saure Partialhydrolyse

von:



Saure Partialhydrolyse

von:



oxylende nur unwesentliche Unterschiede zu verzeichnen sind.

Die von DESNUELLE und BONJOUR gefundene Abstufung ist nur in Bezug auf die Tetrapeptide zu erkennen, jedoch nicht besonders ausgeprägt. Dies ist wahrscheinlich auf die veränderten Reaktionsbedingungen zurückzuführen, denn der die Hydrolyse erleichternde Einfluss von Glutaminsäure und Asparaginsäure richtet sich hier nicht auf die die Säure verknüpfende Bindung, sondern auf die mittelständige Bindung, was aus dem Auftreten von Leu-glu und Leu-asp als Spaltprodukte zu ersehen ist. Als Spaltprodukte auftretende Di-und Tripeptide werden langsamer hydrolysiert als das jeweilige Ausgangspeptid, denn ausser ß-Ala-gly, das schnell hydrolysiert wird, sind alle Spaltprodukte selbst noch nach 40 Stdn. nachweisbar.

IV. Beschreibung der Versuche

Glycinmethylester-hydrochlorid

39,5 g (0,33 Mol) Thionylchlorid werden unter Kühlung (Eis-Kochsalz) langsam zu 250 ccm absol. Methanol getropft. Dann werden unter Rühren 37,5 g (0,5 Mol) Glycin portionsweise eingetragen. Das Gemisch wird dabei auf 40°C erwärmt und zwei Stdn. bei dieser Temperatur belassen. Zunächst tritt klare Lösung ein, dann fällt ein grösserer Teil des Esterhydrochlorides aus. Davon wird abgesaugt und das Filtrat eingedampft. Die dabei ausfallende zweite Portion wird zusammen mit der ersten aus Methanol umkristallisiert.
Ausbeute: 46 g entspr. 74 % d.Th., Schmp. 178 - 180°C
$C_3H_8NO_2Cl$ (125,5)

2,5 - Diketopiperazin[6)]

25 g (0,2 Mol) Glycinmethylester-hydrochlorid werden in 20 ccm Wasser gelöst und mit 28 ccm Triäthylamin versetzt. Innerhalb von 2 Tagen kristallisiert das Produkt aus. Nach Abfiltrieren wird es sorgfältig mit kaltem Wasser gewaschen. Umkristallisieren aus Wasser.
Ausbeute: 5,6 g entspr. 53 % d.Th., Schmp. 311 - 312°C
$C_4H_6N_2O_2$ (114,1)

Cbo - glycyl-glycin[54)]

17,2 g (0,15 Mol) 2,5-Diketopiperazin werden in 90 ccm 2n NaOH und 50 ccm Wasser bis zur klaren Lösung geschüttelt. Dann werden bei 0°C unter Rühren innerhalb von 30 Min. 34 g (0,2 Mol) Carbobenzoxychlorid zugetropft. Nach 5 Stdn. langem Rühren schüttelt man die Lösung zur Entfernung von überschüssigem Carbobenzoxychlorid zweimal mit Äther aus und säuert dann mit kalter, halbkonzentrierter Schwefelsäure an. Das ausgefallene Cbo-glycyl-

glycin wird gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet.
Ausbeute: 31 g entspr. 77 % d.Th., Schmp. 178°C
$C_{12}H_{14}N_2O_5$ (266,1)

Cbo-glycyl-glycin-p-nitrophenylester[55)]

5,3 g (0,02 Mol) Cbo-glycyl-glycin und 3,3 g (0,024 Mol) p-Nitrophenol werden in 40 ccm Pyridin gelöst und nach Abkühlen auf 0°C mit 4,1 g (0,02 Mol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 0,5 Stdn. langem Rühren im Eisbad und 1 Stde. bei Zimmertemperatur wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Umkristallisieren aus Äthanol.
Ausbeute: 5,6 g entspr. 72 % d.Th., Schmp. 156 - 158°C
$C_{18}H_{17}N_3O_7$ (387,2)

Cbo-glycin[16)]

15 g (0,2 Mol) Glycin werden in 50 ccm 4n NaOH gelöst und unter Eiskühlung und heftigem Rühren mit 34 g (0,2 Mol) Cbo-Chlorid und 50 ccm 4n NaOH in 10 kleinen Portionen innerhalb von 40 Min. versetzt. Danach wird ausgeäthert, der Äther verworfen, die Lösung mit konz. Salzsäure kongosauer gemacht, der entstandene Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und nach Trocknen aus Chloroform umkristallisiert.
Ausbeute: 28,5 g entspr. 67 % d.Th., Schmp. 120°C
$C_{10}H_{11}NO_4$ (209,2)

Cbo-glycin-p-nitrophenylester[13,56)]

4,18 g (0,02 Mol) Cbo-glycin und 3,34 g (0,024 Mol) p-Nitrophenol werden in 30 ccm Pyridin gelöst und bei 0°C mit 4,12 g (0,02 Mol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 10 ccm Essigester versetzt. Nach 0,5 Stdn. bei 0°C und 1 Stde. bei Zimmertemperatur wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Filtrat in Vakuum

eingeengt. Umkristallisieren aus Äthanol/Petroläther.
Ausbeute: 5,2 g entspr. 79 % d.Th., Schmp. 124°C
$C_{16}H_{14}N_2O_6$ (330,2)

Cbo-glycin-p-nitrobenzylester[17)]

4,18 g (0,02 Mol) Cbo-glycin, 5,15 g (0,03 Mol) p-Nitrobenzylchlorid und 4,2 ccm (0,03 Mol) Triäthylamin werden über Nacht in 35 ccm Essigester unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wird heiss vom ausgefallenen Triäthylaminhydrochlorid abfiltriert, mit 2 ccm Methanol versetzt, dann mit Wasser, 3 x mit 1n HCl, 1 x mit Wasser, 3 x mit halbgesättigter Natriumbicarbonatlösung, 1 x mit Wasser gewaschen und anschliessend getrocknet. Nach Einengen und Versetzen mit Petroläther erhält man 6,32 g entspr. 92 % d.Th.. Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther.
Schmp. 107 - 109,5°C
$C_{17}H_{16}N_2O_6$ (344,3)

Glycin-p-nitrobenzylester-hydrobromid[17)]

6,44 g (0,02 Mol) Cbo-glycin-p-nitrobenzylester werden in 25 ccm Eisessig gelöst und bei Zimmertemperatur mit 25 ccm 4n Eisessig/HBr versetzt. Nach 40 Min. wird die einen Teil des Produktes bereits in kristalliner Form enthaltende Reaktionslösung mit 100 ccm absol. Äther versetzt und kurze Zeit danach abgesaugt. Nach Umkristallisieren aus Alkohol/Äther erhält man 4,25 g entspr. 81 % d.Th.,
Schmp. 196 - 202°C
$C_9H_{11}N_2O_4Br$ (291,1)

4n Bromwasserstoff in Eisessig

Bromwasserstoff wird durch Zutropfen von Brom in gereinigtes Tetralin entwickelt, welches im Wasserbad leicht erwärmt wird. Dabei taucht die Spitze des Brom enthaltenden Tropftrichters unter die Oberfläche des Tetralins,

um ein übermässiges Verdampfen des Broms zu vermeiden. Durch stetiges Rühren wird für eine gleichmässige Konzentrationsverteilung des zulaufenden Broms gesorgt. Der entstandene Bromwasserstoff wird in mehreren, ebenfalls mit Tetralin gefüllten Waschflaschen von Spuren anhaftenden Broms befreit und in über Acetanhydrid destillierten Eisessig bis zu einer Gewichtszunahme von 324 g/l eingeleitet.

Histidinmethylester-dihydrochlorid[30]

14,5 ccm (0,2 Mol) Thionylchlorid werden langsam unter Rühren in 250 ccm im Eis/Kochsalz-Bad gekühltes Methanol eingetropft. Nach beendeter Zugabe werden in die Lösung portionsweise 15,5 g (0,1 Mol) Histidin eingetragen. Die Mischung wird langsam erwärmt und über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Dann engt man das Lösungsmittel bis auf ca. 1/3 des Volumens ein und kühlt. Nach Absaugen wird das Produkt mit Äther und etwas Essigester gewaschen und über NaOH getrocknet.
Ausbeute: 21,2 g entspr. 88 % d.Th., Schmp. 199 - 200°C
$C_7H_{13}N_3O_2Cl_2$ (242,1)

Cbo-histidinhydrazid[57]

Eine Lösung von 1,50 g (6,2 mMol) Histidinmethylesterdihydrochlorid und 1,73 ccm (12,4 mMol) Triäthylamin in 12,4 ccm Chloroform wird unter Eiskühlung und unter ständigem Rühren mit 0,68 ccm (3,1 mMol) Carbobenzoxychlorid versetzt. Kurze Zeit darauf werden 0,87 ccm (6,2 mMol) Triäthylamin und nochmals 0,68 ccm Cbo-chlorid zugegeben. Nach 45 Min. langem Rühren bei Zimmertemperatur wird die Lösung mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Chloroform durch dreimaliges Abdestillieren unter Zugabe von absol. Äthanol vertrieben. Das zurückbleibende Öl wird in 3 ccm Äthanol gelöst und mit 0,62 ccm 100proz. Hydrazinhydrat versetzt. Nach Stehen über Nacht und anschliessendem Kühlen wird abgesaugt, mit Äther gewaschen

und im Vakuumexsikkator getrocknet.
Ausbeute: ca. 1 g (50 - 60 %), Schmp. 171 - 173°C
Umkristallisieren aus 17 ccm dest. Wasser.
$C_{14}H_{17}N_5O_3$ (303,3)

Cbo-glycyl-histidinhydrazid[6)]

Eine Lösung von 8,4 g (40 mMol) Cbo-glycin und 5,6 ccm (40 mMol) Triäthylamin in 100 ccm Chloroform wird bei -5°C unter Rühren mit 4 ccm (40 mMol) Chlorameisensäureäthylester und nach 15 Min. mit einer Lösung von 9,7 g (40 mMol) Histidinmethylesterdihydrochlorid und 11,2 ccm (80 mMol) Triäthylamin in 100 ccm kaltem Chloroform versetzt. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Zimmertemperatur weitergerührt und anschliessend mit Wasser, 5proz. Hydrogencarbonatlösung und nochmals mit Wasser gewaschen und getrocknet. Nach zweimaligem Verdampfen des Chloroforms unter Zusatz von Methanol wird das zurückbleibende Öl in 50 ccm Methanol gelöst, mit 3 ccm 100proz. Hydrazinhydrat versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur belassen. Auskochen mit absol. Äthanol.
Ausbeute: 6 g entspr. 66 % d.Th., Schmp. 204 - 206°C
$C_{16}H_{20}N_6O_4$ (360,4)

Cbo-leucin[58)]

Zu 13,1 g (100 mMol) Leucin in 50 ccm 2n Natronlauge werden bei 0°C unter Rühren 17 g (100 mMol) Cbo-chlorid und 60 ccm 2n NaOH in mehreren Portionen gegeben. Der beim Ansäuern mit Schwefelsäure entstehende Sirup wird in Äther aufgenommen, die ätherische Lösung mit Natriumbicarbonatlösung ausgeschüttelt, diese Lösung wieder angesäuert, das ölige Produkt in Äther aufgenommen, getrocknet und der Äther im Vakuum entfernt. Das verbleibende Öl wird direkt zur weiteren Reaktion eingesetzt.
Ausbeute: 20 g entspr. 77 % d.Th.
$C_{14}H_{19}NO_4$ (265,3)

Cbo-leucin-p-nitrobenzylester[17)]

5,3 g (20 mMol) Cbo-leucin werden in 40 ccm Essigester zusammen mit 5,15 g (30 mMol) p-Nitrobenzylchlorid und 4,2 ccm (30 mMol) Triäthylamin gelöst und über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Weitere Aufarbeitung wie bei Cbo-glycin-p-nitrobenzylester.
Ausbeute: 5,6 g entspr. 70 % d.Th., Schmp. 63 - 65°C
$C_{21}H_{24}N_2O_6$ (400,3)

Leucin-p-nitrobenzylester-hydrobromid[17)]

Zu einer Lösung von 8 g (20 mMol) Cbo-leucin-p-nitrobenzylester in 30 ccm Eisessig gibt man 30 ccm 4n HBr/Eisessig. Nach 40 Min. langem Stehen bei Zimmertemperatur wird die Lösung im Vakuum auf ca. 1/3 des Volumens eingeengt und mit 30 ccm heissem Essigester und 50 ccm Äther versetzt. Beim Abkühlen kristallisiert das Produkt in farblosen Nadeln aus. Umkristallisieren aus Essigester/Äther.
Ausbeute: 5,6 entspr. 80 % d.Th., Schmp. 132 - 134°C
$C_{13}H_{19}O_4N_2Br$ (347,2)

Cbo-leucin-p-nitrophenylester[13)]

5,3 g (20 mMol) Cbo-leucin und 3,34 g (24 mMol) p-Nitrophenol werden in 40 ccm Essigester gelöst und bei 0°C mit 4,12 g (20 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt. Aufarbeitung wie bei Cbo-glycin-p-nitrophenylester. Umkristallisieren aus wenig Äthanol.
Ausbeute: 3,52 g entspr. 86 % d.Th., Schmp. 95°C
$C_{20}H_{22}N_2O_6$ (386,3)

Cbo-ß-alanin

17,4 g (0,2 Mol) ß-Alanin werden mit 34 g (0,2 Mol) Cbo-Chlorid wie bei Cbo-glycin umgesetzt und aufgearbeitet.

Ausbeute: 33,5 g entspr. 75 % d.Th., Schmp. 106°C
$C_{11}H_{13}NO_4$ (223,2)

Cbo-ß-alanin-p-nitrophenylester

4,46 g (20 mMol) Cbo-ß-alanin und 3,34 g (24 mMol) p-Nitrophenol werden bei 0°C mit 4,12 g (20 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 40 ccm Pyridin umgesetzt. Aufarbeitung wie bei Cbo-glycin-p-nitrophenylester. Umkristallisieren aus Äthanol/Petroläther.
Ausbeute: 5,57 g entspr. 81 % d.Th., Schmp. 93 - 94°C
$C_{17}H_{10}N_2O_6$ (344,3)

Cbo-ß-alanin-p-nitrobenzylester

4,46 g (20 mMol) Cbo-ß-alanin, 5,15 g (30 mMol) p-Nitrobenzylchlorid und 4,2 ccm (30 mMol) Triäthylamin werden in 30 ccm Essigester wie bei Cbo-glycin-p-nitrobenzylester umgesetzt und aufgearbeitet.
Ausbeute: 6,4 g entspr. 89 % d.Th., Schmp. 64 - 65°C
$C_{18}H_{18}N_2O_6$ (358,4) Ber. N 7,82 Gef. N 7,80
Einwaage: 4,193 mg; $V_{korr.}$: 0,294 ccm (29°C/748 Torr.)

ß-Alanin-p-nitrobenzylester-hydrobromid

7,17 g (20 mMol) Cbo-ß- alanin-p-nitrobenzylester werden in 30 ccm Eisessig gelöst und bei Zimmertemperatur mit 30 ccm 4n Eisessig/HBr versetzt. Nach 40 Min. wird die Lösung bei 35°C Badtemperatur im Vakuum eingeengt. Durch Zugabe von absol. Äther kristallisiert das Produkt aus. Nach Absaugen wird mit absol. Äther nachgewaschen. Umkristallisieren aus Essigester/Äther.
Ausbeute: 5,6 g entspr. 91,5 % d.Th., Schmp. 167 - 169°C
$C_{10}H_{13}N_2O_4Br$ (305,1)

Glutaminsäuredibenzylester-hydrochlorid[59)]

44 g (0,3 Mol) Glutaminsäure werden zusammen mit 60 g Benzolsulfonsäure durch kurzes Erwärmen in 300 ccm zu-

vor destilliertem Benzylalkohol gelöst. Die entstandene, klare, braune Lösung wird bei 12 Torr und einer Badtemperatur von 130°C der Destillitation unterworfen. In den ersten beiden Stunden gehen 110 ccm Flüssigkeit über, der Siedepunkt von 95°C sinkt dann aber schnell ab. Die Destillation wird abgebrochen, die abgekühlte Flüssigkeit mit Äther übergossen und im Eisschrank aufbewahrt, wo sie zu einem festen Kristallkuchen erstarrt. Dieser wird zerkleinert, abgesaugt und mit Äther gewaschen. Danach löst man die bräunlich/gelbe Substanz unter Zusatz von 2 g Benzolsulfonsäure unter Erwärmen noch einmal in 300 ccm Benzylalkohol, destilliert wiederum einen Teil der Flüssigkeit, wie beschrieben, ab, übergiesst den Rückstand mit Äther, saugt von den entstandenen Kristallen ab und kristallisiert diese aus wenig Methanol unter Zugabe von Äther um. Die Ausbeute an Glutaminsäuredibenzylester-benzolsulfonat beträgt 90 %.

140 g des so gewonnenen Kristallgutes werden nun mit 400 ccm eiskalter 2n Natronlauge verrührt und der freigesetzte Benzylester 3 x mit je 250 ccm Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet, mit Aktivkohle geklärt und anschliessend mit der berechneten Menge Salzsäure in Äther in einem kleinen Überschuss versetzt. Nach kurzer Zeit kristallisiert das Hydrochlorid des Glutaminsäuredibenzylesters aus.
Ausbeute: 60 g, Schmp. 92°C
$C_{19}H_{22}NO_4Cl$ (363,8)

Asparaginsäure-dibenzylester-hydrochlorid

40 g (0,30 Mol) Asparaginsäure werden auf die gleiche Weise wie Glutaminsäure verestert und in das Hydrochlorid überführt.
Ausbeute: 65 % d.Th., Schmp. 118 - 121°C
$C_{18}H_{20}NO_4$ (349,6)

Cbo-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester[17)]

9,09 g (30 mMol) Cbo-histidinhydrazid gelöst in 72 ccm 1n HCl und 200 ccm Wasser werden bei 0°C durch Zugabe von 2,25 g (32,5 mMol) Natriumnitrit in 15 ccm kaltem Wasser unter kräftigem Rühren in das Azid überführt. 3 Min. nach beendeter Zugabe wird eine kalte Lösung von 10,95 g (31,5 mMol) Leucin-p-nitrobenzylester-hydrobromid und 8,4 ccm (60 mMol) Triäthylamin in 150 ccm Chloroform zugesetzt, wobei so heftig gerührt wird, dass eine innige Vermischung der beiden Phasen eintritt. Die Mischung wird noch 5 Stdn. im Eisbad und über Nacht bei Zimmertemperatur weitergerührt. Dann wird die abgetrennte Chloroformschicht 3 x mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Chloroform-Lösung wird im Vakuum eingedampft und der ölige Rückstand in Essigester aufgenommen. Nach Erhitzen der Lösung wird Äther bis zur bleibenden Trübung zugesetzt, welche durch einige Tropfen Essigester wieder beseitigt wird. Beim Abkühlen kristallisiert das Produkt aus. Nach Absaugen wird mit Äther nachgewaschen. Umkristallisieren aus Essigester/Äther.
Ausbeute: 8,37 g entspr. 52% d.Th., Schmp. 132 - 134°C
$C_{27}H_{31}N_5O_7$ (537,6) Ber. N 13,03 Gef. N 12,98
Einwaage: 3,647 mg; $V_{korr.}$: 0,422 ccm (24,5°C/743 Torr)

Histidyl-leucin-p-nitrobenzylester-dihydrobromid[17)]

5,38 g (10 mMol) Cbo-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester werden in 30 ccm Eisessig gelöst und mit 30 ccm 4n HBr/Eisessig versetzt. Nach 40 Min. wird das Lösungsmittel bei einer Badtemperatur von 30 - 40°C im Vakuum abgezogen. Der ölige Rückstand wird mit Essigester und Äther versetzt und ausgekocht, worauf er erstarrt. Nach Abgiessen des Überstandes wird das Produkt aus absol. Äthanol/Äther umgefällt und abzentrifugiert. Beim Trocknen erhält man ein fast farbloses, hygroskopisches Pulver.
Ausbeute: 5,55 g entspr. 98 % d.Th., Schmp. 123 - 130°C
$C_{19}H_{27}N_5O_5Br_2$ (565,3)

Cbo-glycyl-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester

A) 3,60 g (10 mMol) Cbo-glycyl-histidin-hydrazid werden in 30 ccm 1n HCl gelöst, auf -5°C gekühlt und durch Zugabe von 760 mg (11 mMol) Natriumnitrit in 2 ccm eiskaltem Wasser in das Azid überführt. Nach 5 Min. werden 10 ccm einer kalten, gesättigten Kaliumcarbonatlösung zugegeben. Das ausgefallene Öl wird in 240 ccm kaltem Chloroform gelöst und die wässrige Phase nochmals mit 20 ccm Chloroform ausgewaschen. Die vereinigten Lösungen werden in der Kälte über Natriumsulfat getrocknet.

4,16 g (12 mMol) Leucin-p-nitrobenzylester-hydrobromid werden in 40 ccm Chloroform gelöst und mit 1,4 ccm (10 mMol) Triäthylamin versetzt. Diese Lösung wird auf -5°C gekühlt, mit der Azidlösung vereinigt, dann über Nacht im Eisschrank und einen Tag lang bei Zimmertemperatur belassen. Danach wird zweimal mit Wasser, 2 x mit halbgesättigter Bicarbonatlösung und 2 x mit Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknen der Lösung über Natriumsulfat, Einengen auf ca. 50 ccm und Kühlen kristallisiert das Produkt aus. Umkristallisieren aus Alkohol/Äther.
Ausbeute: 2,25 g entspr. 38 % d.Th., Schmp. 170 - 172°C.
$C_{29}H_{34}N_6O_8$ (594,6) Ber. N 14,14 Gef. N 14,14
Einwaage: 3,592 mg, $V_{korr.}$: 0,452 ccm (24°C/743 Torr)

B) 10,8 g (30 mMol) Cbo-glycyl-histidyl-hydrazid werden in 72 ccm 1n HCl und 10 ccm destilliertem Wasser bei 0°C durch Zugabe von 2,9 g (42 mMol) Natriumnitrit in 15 ccm kaltem Wasser in das Azid überführt. 3 Min. nach beendeter Zugabe wird eine kalte Lösung von 4,2 ccm (30 mMol) Triäthylamin in 100 ccm kaltem Chloroform zugegeben und danach eine Lösung von 11,5 g (33 mMol) Leucin-p-nitrobenzylester-hydrobromid und 4,2 ccm (30 mMol) Triäthylamin in 200 ccm kaltem Chloroform. Die Mischung wird 8 Stdn. lang bei 0°C und über Nacht bei Zimmertemperatur kräftig durchgewirbelt. Dann werden die beiden flüssigen Phasen voneinander getrennt. Die Chloroformschicht wird vom fein-

kristallin ausgefallenen Produkt (5,4 g) abgesaugt und dieses mit feuchtem Chloroform gewaschen. Das Filtrat wird mit Wasser und halbgesättigter Bicarbonatlösung gewaschen, dann über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Nach Zugabe von etwas Essigester erhält man noch 1,65 g des Produktes als amorphes Pulver. Umkristallisieren aus wenig Alkohol.
Ausbeute: 7,05 g entspr. 39 % d.Th., Schmp. 170 - 172°C

Glycyl-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester-dihydrobromid

5,95 g (10 mMol) Cbo-glycyl-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester werden in 40 ccm Eisessig gelöst und mit 40 ccm 4n HBr/Eisessig versetzt. Nach 45 Min. langem Stehen bei Zimmertemperatur wird der grösste Teil des Lösungsmittels im Vakuum verdampft. Das zurückbleibende Öl wird in etwas absol. Äthanol aufgenommen und unter Rühren langsam mit absol. Äther versetzt. Das als Pulver anfallende, hygroskopische Produkt wird abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.
Ausbeute: 5,6 g entspr. 90 % d.Th., Schmp. unscharf zwischen 120 und 130°C

Cbo-glycyl-glycyl-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester

A) 5,65 g (10 mMol) Histidyl-leucin-p-nitrobenzylester-dihydrobromid werden in 30 ccm Dimethylformamid aufgenommen und nach Kühlen auf -10°C mit 2,8 ccm (20 mMol) Triäthylamin versetzt, worauf Triäthylamin-hydrobromid auskristallisiert. Der Lösung werden nun 3,87 g (10 mMol) Cbo-glycyl-glycin-p-nitrophenylester zugegeben, worauf sie 5 Stdn. lang bei 0°C und über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt wird. Vom ausgefallenen Triäthylamin-hydrobromid wird nun abgesaugt und mit wenig Dimethylformamid nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird dann bei einer Badtemperatur von 50°C im Wasserstrahlvakuum (oder im Ölpumpenvakuum bei vorgeschalteter Kühlfalle) abgezogen und der ölige Rückstand in 100 ccm Essigester auf-

genommen. Das in der Lösung noch vorhandene p-Nitrophenol kann durch Waschen nicht entfernt werden, da das Produkt bereits auszufallen beginnt. Nach längerem Stehen im Eisschrank wird von den leicht gelb gefärbten Flokken abgesaugt und mit kaltem Essigester nachgewaschen. Das Produkt wird im Exsikkator getrocknet und dann kurze Zeit mit 50 ccm 0,5n Ammoniaklösung behandelt, wobei sich der grösste Teil des anhaftenden p-Nitrophenols löst. Nach Absaugen und Waschen mit Wasser wird aus Wasser/Pyridin unter Zusatz von Aktivkohle und nochmals aus Pyridin/Wasser umkristallisiert.
Ausbeute: 4,5 g entspr. 69 % d.Th., Schmp. 184 - 186°C
$C_{31}H_{37}N_7O_9$ (651,7) Ber. N 15,05 Gef. N 14,95
Einwaage: 3,864 mg; $V_{korr.}$: 0,522 ccm (24,5°C/733 Torr)

B) 5,1 g (8,25 mMol) Glycyl-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester-dihydrobromid werden in 40 ccm Dimethylformamid gelöst und nach Abkühlen auf -5°C durch Zugabe von 2,3 ccm (16,4 mMol) Triäthylamin in den Ester überführt. Das ausgefallene Triäthylamin-hydrobromid wird in der Lösung belassen. Unter weiterer Kühlung werden 2,28 g (7,5 mMol) Cbo-glycin-p-nitrophenylester zugegeben, worauf die Lösung 5 Stdn. bei 0°C und über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt wird. Nach Absaugen von Triäthylaminhydrobromid wird die Lösung auf dem Wasserbad erwärmt, mit dest. Wasser bis zur Trübung versetzt, worauf die Trübung durch Zusatz von etwas Pyridin wieder beseitigt wird. Beim Abkühlen kristallisiert das Produkt mit leichter Gelbfärbung aus. Umkristallisieren aus Pyridin/Wasser.
Ausbeute: 4,27 g entspr. 87 % d.Th., Schmp. 184 - 186°C
$C_{31}H_{37}N_7O_9$ (651,7) Ber. N 15,05 Gef. N 15,01
Einwaage: 3,962 mg; $V_{korr.}$: 0,535 (26°C/740 Torr)

Glycyl-glycyl-histidyl-leucin

2,50 g (3,84 mMol) Cbo-glycyl-glycyl-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester werden in 70 ccm Dimethylformamid und

20 ccm Wasser gelöst und in eine Schüttelente von 250 ccm Inhalt gegeben. Nach Vertreiben der über der Lösung befindlichen Luftschicht mit Stickstoff wird eine Spatelspitze Palladium/Aktivkohle (ca. 500 mg) zugegeben und die Schüttelente anschliessend evakuiert. Nach Füllen des Gefässes mit Wasserstoff wird die Hydrierungsapparatur in Gang gesetzt und die Wasserstoffaufnahme verfolgt. Nach einiger Zeit fällt ein Teil des Peptides aus und die Wasserstoffaufnahme stockt. Nun wird soviel Wasser zugegeben, bis sich das Peptid wieder löst. Die Wasserstoffaufnahme erfolgt jetzt zügig bis zur Sättigung. Nach weiteren 3 Stdn. (insges. 6 Stdn.) wird durch ein Faltenfilter abfiltriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Wasser heiss gelöst, mit 150 ccm absol. Methanol versetzt und gekühlt. Das ausgefallene Produkt wird aus Wasser/Methanol umkristallisiert.
Ausbeute: 1,25 g entspr. 85 % d.Th., Schmp. 203 - 206°C unter Zersetzung. Chromatographisch rein.
$C_{16}H_{26}N_6O_5$ (382,4) Ber. N 21,97 Gef. N 21,85
Einwaage: 4,196 mg; $V_{korr.}$: 0,844 ccm (28°C/728 Torr)

Cbo-leucyl-glycin-p-nitrobenzylester

Zu einer auf 0°C gekühltem Lösung von 3,2 g (11 mMol) Glycin-p-nitrobenzylester-hydrobromid und 1,4 ccm (10 mMol) Triäthylamin in 10 ccm Chloroform werden 3,86 g (10 mMol) Leucin-p-nitrophenylester gegeben. Nach Stehen über Nacht bei Zimmertemperatur wird die Lösung im Vakuum eingedampft, in 50 ccm Essigester aufgenommen und anschliessend mit Wasser, 1n Ammoniaklösung, Wasser, 1n Salzsäure und Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wird nach Trocknen über Natriumsulfat abgezogen und der Rückstand aus Wasser/Alkohol und Alkohol/Petroläther umkristallisiert.
Ausbeute: 3,7 g entspr. 81 % d.Th., Schmp. 91 - 93°C
$C_{23}H_{27}N_3O_7$ (457,5) Ber. N 9,19 Gef. N 9,14
Einwaage: 4,111 g, $V_{korr.}$: 0,336 ccm (25°C/742 Torr)

Leucyl-glycin-p-nitrobenzylester-hydrobromid

4,57 g (10 mMol) Cbo-leucyl-glycin-p-nitrobenzylester werden in 30 ccm Eisessig gelöst und mit 30 ccm 4n Eisessig/HBr versetzt. Nach 40 Min. bei Zimmertemperatur wird die Lösung im Vakuum bei 30°C eingedampft und das zurückbleibende Öl mit absol. Äther versetzt. Da das Produkt selbst nach längerem Stehen und Reiben nicht kristallisiert, wird es 2 x aus heissem Essigester/Petroläther umgefällt und dann in Essigester gelöst. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakumm erhält man ein glasiges, hygroskopisches Pulver, das beim Aufbewahren verklebt.
Ausbeute: 3,0 g entspr. 74 % d.Th.
$C_{15}H_{22}N_3O_5Br$ (404,3)

Cbo-glycyl-histidyl-leucyl-glycin-p-nitrobenzylester

3,6 g (10 mMol) Cbo-glycyl-histidin-hydrazid werden in 30 ccm 1n Salzsäure gelöst, auf -2°C gekühlt und mit 760 mg (11 mMol) Natriumnitrit in 2 ccm eiskaltem Wasser in das Azid überführt, wobei kräftig gerührt wird. Nach 5 Min. werden 10 ccm einer kalten, gesättigten Kaliumcarbonatlösung zugegeben. Das ausgefallene Öl wird durch Schütteln in 240 ccm kaltem Chloroform gelöst und die wässrige Phase nach Abtrennen nochmals mit 50 ccm kaltem Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformlösungen werden in Kälte durch 5 Min. langes Schütteln mit Natriumsulfat getrocknet und dann filtriert.

4,45 g (11 mMol) Leucyl-glycin-p-nitrobenzylester-hydrobromid werden in 40 ccm Chloroform gelöst und durch Zugabe von 1,4 ccm (10 mMol) Triäthylamin in den Ester überführt. Die Lösung wird auf -5°C gekühlt und dann mit der Azidlösung vereinigt. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank lässt man die Lösung noch einen Tag bei Zimmertemperatur stehen und wäscht dann 2 x mit Wasser, 2 x mit halbgesättigter Bicarbonatlösung, 2 x mit Wasser aus und trocknet über Natriumsulfat. Beim Einengen auf ca. 100 ccm und Kühlen kristallisiert das Produkt aus. Umkristallisiert

wird aus Pyridin/Wasser unter Zusatz von Aktivkohle.
Ausbeute: 3,13 g entspr. 48 % d.Th., Schmp. 206 - 208°C
$C_{31}H_{37}N_7O_9$ (651,7) Ber. N 15,05 Gef. N 15,01
Einwaage: 3,664 mg, $V_{korr.}$: 0,497 ccm (24,5°C/733 Torr)

Glycyl-histidyl-leucyl-glycin

1,64 g (2,5 mMol) Cbo-Glycyl-histidyl-leucyl-glycin-p-nitrobenzylester werden in 50 ccm Eisessig gelöst und mit 50 ccm Methanol versetzt. Nach Zugabe einer Spatelspitze Palladium/Aktivkohle wird in einer Schüttelente hydriert. Die Wasserstoffaufnahme erfolgt sehr schnell und ist nach ca. 20 Min. bereits beendet. Die Lösung wird noch 2 Stdn. in der Hydrierungsapparatur geschüttelt und dann durch ein Faltenfilter filtriert. Nach Eindampfen im Vakuum bleibt ein gelbliches Öl zurück, das 2 x in etwas dest. Wasser gelöst und wieder eingedampft wird. Dann wird restliches Wasser durch Zugabe und Abdestillieren von absol. Äthanol vertrieben und der jetzt feste Rückstand mit absol. Äthanol ausgekocht. Nach Abkühlen, Absaugen und Trocknen erhält man ein blassgelbes, amorphes, in Wasser gut lösliches Pulver. Ausbeute: 0,88 g entspr. 92 % d.Th. Zur Entfernung von etwa anhaftender Essigsäure und zur Beseitigung der schwachen Gelbfärbung wird das Produkt in 20 ccm dest. Wasser gelöst, mit wenig Aktivkohle versetzt, filtriert und nach Einengen der Lösung auf ein kleines Volumen mit Pyridin gefällt. Nach Umkristallisieren aus Wasser/Methanol erhält man das Tetrapeptid in Form von farblosen Nadelbüscheln. Trocknen über P_2O_5. Chromatographisch rein.
Ausbeute: 0,67 g entspr. 70 % d.Th., Schmp. 197 - 201°C unter Zers.
$C_{16}H_{26}N_6O_5$ (382,4) Ber. N 21,97 Gef. N 21,89
Einwaage: 3,176 mg, $V_{korr.}$: 0,629 ccm (24,5°C/732 Torr)

Cbo-ω-alanyl-glycyl-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester

3,42 g (5,5 mMol) Glycyl-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester-dihydrobromid werden in 25 ccm Dimethylformamid gelöst und bei -10°C durch Zugabe von 1,40 ccm (10 mMol)

Triäthylamin in den Ester überführt. Die Lösung wird dann, ohne vorher das ausgefallene Triäthylaminhydrobromid zu entfernen, mit 1,72 g (5 mMol) Cbo-ß-alanin-p-nitrophenylester versetzt. Zuerst wird 5 Stdn. lang bei 0°C gerührt und dann 1 Tag bei Zimmertemperatur belassen. Nach Absaugen vom Triäthylaminhydrobromid und Nachwaschen mit wenig Dimethylformamid wird im Wasserstrahlvakuum bei 50°C Badtemperatur weitgehend eingeengt und das zurückbleibende Öl in 300 ccm Essigester aufgenommen. Die gelbe Lösung wird 2 x mit Wasser, 5 x mit 1n Ammoniak und noch 2 x mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Anschliessend wird bis auf 100 ccm eingeengt, leicht erwärmt, mit Äther versetzt und gekühlt, wobei das Produkt ausfällt. Umkristallisieren aus Pyridin/Wasser unter Zusatz von Aktivkohle. Zur Entfernung von noch anhaftender Aktivkohle wird nochmals aus Pyridin/Wasser umkristallisiert.
Ausbeute: 2,5 g entspr. 75 % d.Th., Schmp. 180 - 182°C
$C_{32}H_{39}N_7O_9$ (665,7) Ber. N 14,68 Gef. N 14,82
Einwaage: 3,936 mg, $V_{korr.}$: 0,526 ccm (23,5°C/732 Torr)

ß-Alanyl-glycyl-histidyl-leucin

0,90 g (1,35 mMol) Cbo-ß-alanyl-glycyl-histidyl-leucin-p-nitrobenzylester werden in 80 ccm Dimethylformamid gelöst und nach Zugabe einer Spatelspitze Palladium/Aktivkohle hydriert. Im Laufe der Hydrierung fällt das Peptid aus, worauf die Wasserstoffaufnahme nahezu zum Stillstand kommt. Deshalb setzt man soviel dest. Wasser zu, bis das Peptid wieder gelöst ist. Die Hydrierung verläuft dann rasch bis zur Beendigung. Die Lösung wird vom Katalysator durch ein Faltenfilter abfiltriert, und im Wasserstrahlvakuum bei 50°C bis fast zur Trockne eingedampft. Dabei fällt das Peptid aus. Es wird mit 50 ccm absol. Äthanol ausgekocht und nach Abkühlen im Eisschrank abfiltriert. Umkristallisiert wird aus wenig Wasser und Methanol.
Ausbeute: 0,51 g entspr. 95 % d.Th., Schmp. 252 - 255°C unter Zers. Chromatographisch rein.

$C_{17}H_{28}N_6O_5$ (396,5) Ber. N 21,19 Gef. N 21,26
Einwaage: 4,676 mg, $V_{korr.}$: 0,891 ccm (22°C/733 Torr)

Cbo-leucyl-ß-alanin-p-nitrobenzylester

3,86 g (10 mMol) Cbo-leucin-p-nitrophenylester werden zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 3,32 g (12 mMol) ß-Alanin-p-nitrobenzylester-hydrobromid und 1,4 ccm (10 mMol) Triäthylamin in 15 ccm Chloroform gegeben. Die Lösung wird unter Rühren 5 Stdn. bei 0°C und über Nacht bei Zimmertemperatur belassen. Nach Eindampfen im Vakuum wird in Essigester und dest. Wasser aufgenommen. Die organ. Phase wird mit Wasser, 4 x mit 1n Ammoniak, 2 x mit Wasser, 2 x mit 1n HCl und noch 2 x mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der ölige Rückstand wird in absol. Äthanol heiss gelöst, mit Petroläther versetzt und gekühlt, wobei das Produkt auskristallisiert. Umkristallisieren aus Alkohol/Petroläther.
Ausbeute: 4,03 g entspr. 86 % d.Th., Schmp. 91 - 93°C
$C_{24}H_{29}N_3O_7$ (471,5) Ber. N 8,91 Gef. 8,90
Einwaage: 3,358 mg, $V_{korr.}$: 0,267 ccm (25°C/743 Torr)

Leucyl-ß-alanin-p-nitrobenzylester

9,43 g (20 mMol) Cbo-leucyl-ß-alanin-p-nitrobenzylester werden in 50 ccm Eisessig gelöst, mit 50 ccm 4n HBr/Eisessig versetzt und 45 Min. lang bei Zimmertemperatur belassen. Danach wird die Lösung im Vakuum eingeengt, das zurückbleibende Öl in Essigester aufgenommen und mit Petroläther gefällt. Da das Produkt nicht kristallisiert, wird der Überstand abgegossen und das Öl in Wasser gelöst. Die wässrige Lösung schüttelt man 2 x mit Äther aus und versetzt sie dann mit gesättigter Kaliumcarbonatlösung bis zur deutlichen alkalischen Reaktion. Das in Form des freien Esters vorliegende Produkt wird mit Essigester ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man ein fast farbloses Öl, welches direkt weiter verwendet wird.
Ausbeute: 5,6 g entspr. 83 % d.Th.

$C_{16}H_{23}N_3O_5$ (337,5)

Cbo-glycyl-histidyl-leucyl-ß-alanin-p-nitrobenzylester

3,6 g (10 mMol) Cbo-glycyl-histidin-hydrazid werden in 24 ccm ln. Salzsäure und in 30 ccm Wasser aufgelöst und bei 0°C unter heftigem Rühren durch Zugabe von 970 mg (14 mMol) Natriumnitrit in 3 ccm kaltem Wasser in das Azid überführt. Nach 5 Min. wird unter weiterer Kühlung eine Lösung von 1,4 ccm (10 mMol) Triäthylamin in 50 ccm kaltem Chloroform und anschliessend eine Lösung von 3,40 g (10 mMol) Leucyl-ß-alanin-p-nitrobenzylester in 150 ccm kaltem Chloroform zugegeben. Die Mischung wird 5 Stdn. lang bei 0°C und über Nacht bei Zimmertemperatur heftig gerührt. Die das auskristallisierte Produkt enthaltende Chloroformschicht wird von der wässrigen Phase abgetrennt, mit Wasser gewaschen und gekühlt. Dann saugt man vom Produkt ab und wäscht dieses mit wenig kaltem Chloroform. Umkristallisieren aus Pyridin/Wasser. Ausbeute: 3,6 g entspr. 45 % d.Th., Schmp. 194 - 195°C
$C_{32}H_{39}N_7O_9$ (665,7) Ber. N 14,68 Gef. N 14,72
Einwaage: 3,589 mg, $V_{korr.}$: 0,482 ccm (27°C/732 Torr)

Glycyl-histidyl-leucyl-ß-alanin

1,93 g (2,9 mMol) Cbo-glycyl-histidyl-leucyl-ß-alanin-p-nitrobenzylester werden in 80 ccm Dimethylformamid gelöst und nach Zugabe einer Spatelspitze Palladium/Aktivkohle hydriert. Die Wasserstoffaufnahme erfolgt sehr langsam. Nach ca. 4 Stdn. fällt das Peptid als Gallerte aus, ohne dass dadurch die Wasserstoffaufnahme zum Stillstand kommt. Nach weiteren 3 Stdn. wird das Lösungsmittel von Peptid und Katalysator abgesaugt und mit wenig absol. Äthanol nachgewaschen. Der in der Nutsche befindliche Rückstand wird mit Wasser versetzt, wobei das Peptid in Lösung geht und dann vom Katalysator abgesaugt wird. Man engt bis auf geringes Volumen ein, erwärmt dann leicht,

gibt ca. 50 ccm Methanol zu und lässt bei Zimmertemperatur stehen. Die nach einiger Zeit einsetzende Kristallisation wird durch anschliessendes Abkühlen vermehrt. Umkristallisieren aus wenig Wasser/Methanol.
Ausbeute: 0,72 g entspr. 63 % d.Th., Schmp. 198 - 204°C unter Zers. Chromatographisch rein.
$C_{17}H_{28}N_6O_5$ (396,5) Ber. N 21,19 Gef. N 21,16
Einwaage: 2,950 mg, $V_{korr.}$: 0,561 ccm (24,5°C/737 Torr)

Cbo-leucyl-glutaminsäure-dibenzylester

16 g (44 mMol) Glutaminsäure-dibenzylester-hydrochlorid werden in 70 ccm Chloroform unter Zugabe von 5,6 ccm (40 mMol) Triäthylamin gelöst und bei -10°C mit 15,4 g (40 mMol) Cbo-leucin-p-nitrophenylester versetzt. Nach 5-stündigem Rühren bei 0°C lässt man über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Dann wird im Vakuum bis fast zur Trockne eingeengt, der Rückstand in 100 ccm Essigester aufgenommen und die Lösung wie üblich mit Wasser, 1n Ammoniak und 1n Salzsäure gewaschen und getrocknet. Nach Einengen bis auf 50 ccm wird auf dem Dampfbad erhitzt, mit Petroläther bis zur Trübung versetzt und diese durch Zugabe von wenig Essigester beseitigt. Beim langsamen Abkühlen kristallisiert das Produkt in Form von verfilzten Nadeln aus. Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther oder Alkohol/Wasser.
Ausbeute: 18,4 g entspr. 80 % d.Th.,
Schmp. 85 - 87°C (Lit. 77-78°C)[59]
$C_{33}H_{38}N_2O_7$ (574,7) Ber. N 4,88 Gef. N 4,80
Einwaage: 4,635 mg, $V_{korr.}$: 0,200 ccm (29°C/748 Torr)

Leucyl-glutaminsäure-dibenzylester

25,8 g (45 mMol) Cbo-leucyl-glutaminsäure-dibenzylester werden in 60 ccm Eisessig gelöst und mit 60 ccm 4n HBr/Eisessig versetzt und 10 Min. lang bei Zimmertemperatur belassen. Dann wird die Lösung in einen 500 ccm Petroläther enthaltenden Scheidetrichter gegossen und gut durch-

geschüttelt. Das sich als untere Schicht abscheidende Öl wird in eine halbgesättigte Kaliumcarbonatlösung eingerührt und ebenfalls gut durchgeschüttelt. Der nun freigesetzte Dibenzylester wird in Äther aufgenommen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels erhält man ein farbloses, zähes Öl.
Ausbeute: 11,25 g entspr. 57 % d.Th.
$C_{25}H_{32}N_2O_5$ (440,5)

Cbo-leucyl-asparaginsäure-dibenzylester

15,4 g (44 mMol) Asparaginsäure-dibenzylester-hydrochlorid werden in 70 ccm Chloroform mit 5,6 ccm (40 mMol) Triäthylamin und 16 g (40 mMol) Cbo-leucin-p-nitrophenylester wie üblich umgesetzt und aufgearbeitet. Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther.
Ausbeute: 19,5 g entspr. 87 % d.Th.,
Schmp. 108 - 110°C (Lit. 106 - 108°C)[59]
$C_{32}H_{36}N_2O_7$ (560,7) Ber. N 4,99 Gef. N 4,97
Einwaage: 4,605 mg, $V_{korr.}$: 0,205 ccm (23,5°C/737 Torr)

Leucyl-asparaginsäure-dibenzylester

19,5 g (35 mMol) Cbo-leucyl-asparaginsäure-dibenzylester werden in 50 ccm Eisessig gelöst, mit 50 ccm 4n HBr/Eisessig versetzt und 15 Min. lang bei Zimmertemperatur belassen. Aufarbeitung erfolgt wie bei Leucyl-glutaminsäure-dibenzylester.
Ausbeute: 9,0 g entspr. 60 % d.Th.
$C_{24}H_{30}N_2O_5$ (426,5)

Cbo-glycyl-histidyl-leucyl-glutaminsäure-dibenzylester

9,0 g (25 mMol) Cbo-glycyl-histidin-hydrazid werden in 55 ccm 1n Salzsäure und 60 ccm Wasser gelöst und unter Rühren bei 0°C durch Zugabe von 2,42 g (35 mMol) Natriumnitrit in 10 ccm kaltem Wasser in das Azid überführt. Nach 3 Min. werden 3,5 ccm (25 mMol) Triäthylamin in

100 ccm kaltem Chloroform zugegeben und anschliessend 11,0 g (25 mMol) Leucyl-glutaminsäure-dibenzylester in 200 ccm kaltem Chloroform. Die Mischung wird 5 Stdn. bei 0°C und über Nacht bei Zimmertemperatur heftig gerührt. Dann werden unter weiterem Rühren 200 ccm Wasser zugegeben. Die beiden Phasen werden im Scheidetrichter getrennt und die das auskristallisierte Produkt enthaltende Chloroformschicht von diesem abgesaugt. Es wird mit wenig kaltem Chloroform nachgewaschen (Ausbeute: 4,4 g). Die vereinigten Filtrate wäscht man mit Wasser, halbgesättigter Bicarbonatlösung und Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt auf ein kleines Volumen ein. Dann wird in Essigester aufgenommen und gekühlt, wobei noch 2,45 g des Produktes ausfallen. Umkristallisiert wird aus Pyridin/Wasser.
Ausbeute: 6,85 g entspr. 37 % d.Th., Schmp. 191 - 192°C
$C_{41}H_{48}N_6O_9$ (768,9) Ber. N 10,94 Gef. N 11,00
Einwaage: 3,573 mg, $V_{korr.}$: 0,353 ccm (23,5°C/735 Torr)

Glycyl-histidyl-leucyl-glutaminsäure

5,56 g (7,25 mMol) Cbo-glycyl-histidyl-leucyl-glutaminsäure-dibenzylester werden in 200 ccm Methanol unter Erwärmen gelöst. Dann gibt man Wasser bis zur Trübung zu und beseitigt diese durch erneutes Erwärmen. Nach Zugabe einer Spatelspitze Palladium/Aktivkohle wird filtriert, wobei die Temperatur anfänglich auf ca. 40°C gehalten wird. Die Wasserstoffaufnahme erfolgt zügig. Nach einiger Zeit fällt das Peptid aus und wird durch Versetzen mit Wasser wieder gelöst. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme lässt man die Hydrierapparatur noch 2 Stdn. laufen und filtriert dann durch ein Faltenfilter ab. Die Lösung wird bis auf ein kleines Volumen eingeengt, wobei das Peptid ausfällt. Den Rückstand kocht man mit absol. Methanol aus und saugt nach Abkühlen im Eisschrank ab. Umkristallisieren aus wenig Wasser.
Ausbeute: 2,84 g entspr. 87 % d.Th., Schmp. 205 - 208°C

unter Zers. Chromatographisch rein.
$C_{19}H_{30}N_6O_7$ (454,5) Ber. N 18,49 Gef. N 18,40
Einwaage: 3,118 mg, $V_{korr.}$: 0,522 ccm (24,5°C/728 Torr)

Cbo-glycyl-histidyl-leucyl-asparaginsäure-dibenzylester

7,2 g (20 mMol) Cbo-glycyl-histidyl-hydrazid werden in 48 ccm 1n Salzsäure gelöst und mit 60 ccm dest. Wasser versetzt. Nach Abkühlen auf 0°C werden unter Rühren 1,96 g (28 mMol) Natriumnitrit in 20 ccm kaltem Wasser zugegeben. 3 Min. nach beendeter Zugabe versetzt man die Lösung unter heftigem Rühren mit einer Lösung von 2,8 ccm (20 mMol) Triäthylamin in 100 ccm kaltem Chloroform und anschliessend mit einer Lösung von 9,0 g (21 mMol) Leucyl-asparaginsäure-dibenzylester in 100 ccm Chloroform. Es wird noch 5 Stdn. bei 0°C und über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Aufarbeitung erfolgt wie bei Cbo-glycyl-histidyl-leucyl-glutaminsäure-dibenzylester. Umkristallisiert wird aus Pyridin/Wasser.
Ausbeute: 4,33 g entspr. 30 % d.Th., Schmp. 192 - 194°C
$C_{40}H_{46}N_6O_9$ (754,8) Ber. N 11,14 Gef. N 11,13
Einwaage: 3,374 mg, $V_{korr.}$: 0,339 ccm (25°C/733 Torr)

Glycyl-histidyl-leucyl-asparaginsäure

4,35 g (5,75 mMol) Cbo-glycyl-histidyl-leucyl-asparaginsäure-dibenzylester werden in 50 ccm Dimethylformamid gelöst und mit Wasser bis zur Trübung versetzt, welche durch etwas Dimethylformamid wieder beseitigt wird. Dann hydriert man wie üblich, löst das nach einiger Zeit ausfallende Peptid durch Wasserzugabe wieder auf und hydriert bis zur Beendigung weiter. Nach Filtrieren durch ein Faltenfilter wird bis fast zur Trockne eingedampft, wobei das Peptid ausfällt. Es wird in wenig Wasser gelöst und mit absol. Methanol gefällt. Es fällt in Form eines amorphen, hygroskopischen Pulvers an. Reinigung durch zweimaliges Umfällen aus Wasser/absol. Äthanol.
Ausbeute: 2,0 g entspr. 79 % d.Th., Schmp. 179 - 185°C

unter Zers.
$C_{18}H_{28}N_6O_7$ (440,5) Ber. N 19,08 Gef. N 19,16
Einwaage: 4,230 mg, $V_{korr.}$: 0,739 ccm (25°C/728 Torr)
Die chromatographische Reinheitsprüfung ergab einen Fleck mit einem dünnen Schwanz in Richtung auf kleinere R_f-Werte. Die Farbintensität dieser Verunreinigung war jedoch so gering, dass auf eine weitere Reinigung, bzw. weitere Versuche zur Kristallisation verzichtet werden konnte.

Chromatographie

Die chromatographische Untersuchung der Peptide und der Zwischenprodukte erfolgte auf Dünnschichtplatten (Kieselgel G, Firma E. Merk AG., Darmstadt) oder auf Papier (Schleicher & Schüll, No. 2043 b) in mehreren Laufmittelsystemen. Entwickelt wurde bei histidinhaltigen Verbindungen mit Pauli-Reagens und im Falle der am Aminoende ungeschützten Peptide oder Peptidester mit Ninhydrin.

Potentiometrische Titration

Die pH-Messung wurde in einem thermokonstanten Raum bei 25°C mit einer voll automatischen Apparatur (Fa. Radiometer, Kopenhagen), bestehend aus Titrator (Type TTT 1) und Titrigraph (Type SBR 2) durchgeführt. Je 0,05 mMol des zu untersuchenden Peptides wurden in 10 ccm einer 0,1n KCl-Lösung (J~1) gelöst und mit 0,1 ml 0,5n HCl versetzt. Titriert wurde mit 0,5n KOH unter reinstem mit 50proz. Kalilauge gewaschenem Stickstoff (Elektroden: Glas:Kalomel). Die pK-Werte wurden den Titrationskurven direkt entnommen.

Abbauversuche

Die einzelnen Peptide wurden mit den unten angegebenen, zu den Spaltungsversuchen verwendeten Lösungen versetzt

und in einem verschlossenen Gefäss mit Hilfe eines Ultra-Thermostaten (Fa. Gebr. Hanke, Berlin) bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitintervallen (5 Min. - 40 Stdn.) wurden den Lösungen jeweils gleichgrosse Proben entnommen und auf Papier aufgetragen. Nach Trocknung bzw. Inaktivierung wurde in frisch angesetztem Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) über Nacht aufsteigend chromatographiert. Entwickelt wurde mit Ninhydrin und Paulireagens.

1. Proteolytische Fermente

Jeweils 0,01 mMol der zu untersuchenden Peptide wurden in 0,5 ccm Enzym-Pufferlösung gelöst und bei 37°C inkubiert. Nach Auftragen auf das Chromatographierpapier wurden die Proben zur Inaktivierung der Enzyme 5 Min. lang auf 120°C erhitzt.

Folgende Enzym-Pufferlösungen wurden aus käuflichen Enzympräparaten angesetzt:

1 mg Trypsin (C.F. Boehringer u. Söhne, Mannheim) in 10 ccm Phosphatpuffer pH 8,0

1 mg α-Chymotrypsin (C.F. Boehringer u. Söhne) in 10 ccm Phosphatpuffer pH 8,0

2,5 mg Pepsin (3 x krist., Nutritional Biochem. Corp. Cleveland, Ohio) in 10 ccm Biphtalatpuffer pH 3,0

20 mg Leucinaminopeptidase (techn., August Hedinger, Stuttgart) in 10 ccm Phosphatpuffer pH 8,0 (0,005 m $MgSO_4$)

10 mg Pronase (B grade, California Corp. for Biochem. Research, Los Angeles) in 10 ccm Phosphatpuffer pH 7,5

10 mg Papain (3 x krist. Nutritional Biochem. Corp. Cleveland, Ohio) in 10 ccm Phosphatpuffer pH 7,0 (0,005 m Cystein·HCl·H_2O und 0,001 m Komplexon III, 0,5 Stdn. bei 37°C vorinkubiert).

10 mg Ficin (3 x krist. Nutritional Biochem. Corp. Cleveland, Ohio) in 10 ccm Phosphatpuffer pH 7,0

(0,005 m Cystein·HCl·H_2O und 0,001 m Komplexon III, 0,5 Stdn. bei 37°C vorinkubiert).

Die Aktivität von Leucinaminopeptidase wurde an L-Leucylglycin und die von Trypsin, Papain und Ficin an Benzoylargininamid geprüft.

2. Seren

Frisches Kaninchenblut wurde in einem Zentrifugenglas über Nacht bei +4°C im Eisschrank belassen, dann zentrifugiert und das überstehende Serum abpippetiert. Jeweils 0,5 ccm davon wurden mit 0,01 mMol der einzelnen Peptide vermischt und auf die oben beschriebene Weise inkubiert.
Humanserum wurde auf die gleiche Weise gewonnen und in der gleichen Menge für die Abbauversuche verwendet, nur dass dabei ausschliesslich in Kunststoffgefässen gearbeitet wurde.

Citratplasma wurde folgendermassen gewonnen: 20 ccm menschliches Blut wurden mit 4 ccm einer 3,8proz. Natriumcitratlösung versetzt. Nach Abzentrifugieren der Erythrozyten und der Leukozyten wurde das Plasma abpippetiert und in dieser Form für die Abbauversuche verwendet.

3. Säurehydrolyse

a) Partialhydrolyse durch konz. Salzsäure: In je 0,5 ccm 10n HCl wurden 0,01 mMol der zu untersuchenden Substanz gelöst, auf oben beschriebene Weise inkubiert und dann nach Trocknen im Luftstrom chromatographiert.

b) Totalhydrolyse:
Eine kleine Probe der zu hydrolysierenden Verbindung wurde in einem 20 ml Schliffkolben mit 1 ccm konz. HCl übergossen und nach dichtem Verschliessen

bei 120°C über Nacht im Trockenschrank aufbewahrt. Die Lösung wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand in wenig Wasser gelöst. Durch Chromatographie wurde die Aminosäurezusammensetzung ermittelt.

Analysen

Die Stickstoffbestimmungen wurden am Institut für physiologische Chemie der Universität Tübingen nach der Methode von Dumas ausgeführt.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Gerät nach Tottoli (Fa. Büchi, Flawil/Schweiz) oder im Schmelzpunktsmikroskop bestimmt und sind nicht korrigiert.

V. Zusammenfassung

Sechs bisher nicht beschriebene Tetrapeptide mit mittelständigem Histidin wurden synthetisch dargestellt:

Gly-gly-his-leu (1), ß-Ala-gly-his-leu (2),
Gly-his-leu-gly (3), Gly-his-leu-ß-ala (4),
Gly-his-leu-glu (5), Gly-his-leu-asp (6).

Sämtliche Aminogruppen wurden durch Carbobenzoxylierung, die Carboxylgruppen durch Veresterung zu p-Nitrobenzylestern oder Benzylestern geschützt. Die geschützten Peptide wurden nach der Methode der "aktiven Ester", über "gemischte Anhydride" sowie nach der Azidmethode synthetisiert. Katalytische Hydrierung ergab die freien Peptide.

Die Peptide 3 - 6 werden durch Humanserum und Kaninchenserum nahezu vollständig in die einzelnen Aminosäuren gespalten. Peptid 2 wird praktisch nicht angegegriffen (nur in Spuren vom Carboxylende her); Peptid 1 nimmt eine Mittelstellung ein.

Citratplasma wirkt gleichartig, wie Normalserum, jedoch etwas schwächer, während der Angriff durch isolierte Leucinaminopeptidase in geringerem Masse erfolgt.

Papain und Ficin spalten die Peptide an verschiedenen Peptid-Bindungen, wobei die Peptide 2, 4 und 6 bemerkenswert stabil sind.

Pronase spaltet sämtliche Peptide, einzelne davon innerhalb von wenigen Minuten. Die Peptidbruchstücke Gly-his, Gly-gly-his und ß-Ala-gly-his werden praktisch nicht mehr weitergespalten.

Durch saure Partialhydrolyse werden die Tetrapeptide in nahezu sämtliche Peptidbruchstücke zerlegt, wobei der Angriff hauptsächlich in der Mitte der Peptide erfolgt.

Im Vergleich zu Dipeptiden und Tripeptiden beobachtet man bei Tetrapeptiden mit gleicher Sequenz stets eine grössere Hydrolysebereitschaft.

VI. Literaturverzeichnis

1) R. Schwyzer, Helv. chim. Acta 44, 667 (1961)
2) M. Bumpus, K. Arakawa, J. Page, R. Smeby, Biochim. biosphysica Acta (Amsterdam) 46, 38 (1961)
3) R. Smeby, K. Arakawa, M. Bumpus, R. Marsh, Biochim. biosphysica Acta (Amsterdam) 58, 550 (1962)
4) H.J. Hess, W.T. Moreland u. G.D. Laubach, J. Amer. chem. Soc. 85, 4040 (1963)
5) D. Klaus, H. Kaffarnik u. H. Pfeil, Klin. Wschr. 41, 376 (1963)
6) F. Schneider, Hoppes-Seyler's Z. physiol. Chem. 321, 38 (1960)
7) Th. Curtius, J. prakt. Chem. 70, 109 (1904)
8) E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 659, 168 (1962)
9) Th. Wieland, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 (1951)
10) R.A. Boissonas Helv. chim. Acta 34, 874 (1951)
11) J.R. Vaughan, J. Amer. chem. Soc. 74, 676 (1952)
12) M. Bodanszky, Nature (London) 175, 685 (1955)
13) M. Bodanszky u. V. Du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. 81, 5688 (1959)
14) R. Schwyzer, Liebigs Ann. Chem. 655, 189 (1962)
15) J.C. Sheehan, G.P. Hess, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955)
16) M. Bergmann u. L. Zervas, Chem. Ber. 65, 1192 (1932)
17) H. Schwarz u. K. Arakawa, J. Amer. chem. Soc. 81, 5691 (1959)
18) U. Weber, Diplomarbeit, Tübingen (1963)
19) J.A. Maclaren, Australian J. Chem. 11, 360 (1958)
20) L. Kisfaludy, S. Dualsky u. J. Bayer, Chimia 14, 368 (1960)
21) F. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 334, 26 (1963)
22) Landoldt - Börnstein (1960)
23) The Enzymes, Vol. IV, Academic Press, London 1960
24) E.L. Smith u. M. Bergmann, J. biol. Chemistry 138, 789 (1941)

25) E.L. Smith u. D.H. Spackman, J. biol. Chemistry 212, 271 (1955)
26) E.L. Smith u. W.J. Polglase, J. biol. Chemistry 180, 1209 (1949)
27) H.T. Hanson u. E.L. Smith, J. biol. Chemistry 175, 833 (1948)
28) E.L. Smith, D.H. Spackman u. W.J. Polglase, J. biol. Chemistry 199, 801 (1952)
29) H. Zahn u. K. Ziegler, Liebigs Ann. Chem. 610, 132 (1957)
30) U. Weber, Dissertation, Tübingen 1964
31) C.A. Dekker, S.P. Taylor u. J.S. Fruton, J. biol. Chemistry 180, 155 (1949)
32) M. Bergmann u. J.S. Fruton, Advances in Enzymology 1, 63 (1941)
33) H.O. Calvery, J. biol. Chemistry 102, 73 (1933)
34) M. Nomoto, Y. Narahashi, J. Biochemistry (Tokyo) 46, 653 (1959)
35) M. Nomoto, Y. Narahashi u. M. Murakami, J. Biochemistry (Tokyo) 48, 593 (1960)
36) G.A. Fleisher, J. biol. Chemistry 205, 925 (1953)
37) R.J. Haschen, Biochem. Z. 334, 560 (1961)
38) G.A. Fleisher, Arch. Biochem. Biophysics 61, 119 (1956)
39) R.J. Haschen, Biochem. Z. 334, 569 (1961)
40) R.J. Haschen, Clin. Chim. Acta 6, 322 (1961)
41) R.J. Haschen, Clin. Chim. Acta 6, 521 (1961)
42) R.J. Haschen, Clin. Chim. Acta 6, 316 (1961)
43) R.J. Haschen, Klin. Wschr. 39, 466 (1961)
44) K. Heyns u. W. Königsdorf, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 295, 244 (1953)
45) L. Lawrence u. W.J. Moore, J. Amer. chem. Soc. 73, 3973 (1951)
46) E.F. Hammel u. S. Glastone, J. Amer. chem. Soc. 76, 374 (1954)
47) J.R. Whitaker u. F.E. Deatherage, J. Amer. chem. Soc. 77, 3360 (1955)

48) J.I. Harris, R.D. Cole u. N.G. Pon, Biochem. J. 62, 154 (1956)
49) W. Kern u. B. Scherhag, Makromolekulare Chem. 28, 209 (1958)
50) D.A. Long u. J.E. Lillycrop, Transactions of the Faraday Society 59, 907 (1963)
51) D.A. Long u. T.G. Truscott, Trans. Faraday Soc. 59, 918 (1963)
52) P. Desnuelle u. G. Bonjour, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 9, 356 (1952)
53) H. Zahn u. H.R. Falkenburg, Liebigs Ann. Chem. 636, 117 (1960)
54) K. Heyns u. M. Rolle, Chem. Ber. 92, 2439 (1959)
55) G. Zankl, Dissertation, Tübingen 1962
56) B. Iselin, W. Rittel, P. Sieber u. R. Schwyzer, Helv. chim. Acta 40, 373 (1957)
57) R.W. Holley u. E. Sondheimer, J. Amer. chem. Soc. 76, 1326 (1954)
58) S.W. Fox, M. Fling u. H. Wax, J. Amer. chem. Soc. 72, 1862 (1950)
59) M. Liefländer, Dissertation, Göttingen 1958

Lebenslauf

Am 17. Juli 1937 wurde ich als Sohn des Architekten Dr. Walter Ruff und seiner Ehefrau Gabriele, geb. Weigle, in Stuttgart geboren. 1944 zog meine Familie nach Schwäb.Gmünd um, wo ich die Volksschule und anschliessend die Oberschule besuchte. Ab 1949 wohnten wir wieder in Stuttgart. Dort legte ich im Frühjahr 1956 die Reifeprüfung am Eberhard-Ludwigs-Gymnasium ab. Bis zum Diplomvorexamen studierte ich an der Technischen Hochschule Stuttgart und dann an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich 1961 das Diplomexamen ablegte und anschliessend am Institut für Organische Chemie mit der Ausführung der Diplomarbeit beschäftigt war. Die Doktorarbeit fertigte ich von 1962 - 1964 am Institut für physiologische Chemie der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen an.

Meine akademische Ausbildung verdanke ich den folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie:	E.Buddecke, A.Butenandt, F.Lynen, F.Schneider, G.Weitzel
Organische Chemie :	H.Behringer, H.Bredereck, R.Huisgen, F.Klages, H.Stetter
Anorganische Chemie :	H.-J.Becher, W.Bues, E.O.Fischer, J.Goubeau, W.Rüdorff, M.Schmidt, E.Wiberg
Physikalische Chemie :	G.Dickel, Th.Förster, G.-M.Schwab
Physik :	H.Kneser, M.Kulp, G.Mack, G.Möllenstedt
Mineralogie :	W.Frhr.v.Engelhardt, J.-E.Hiller
Maschinenkunde :	R.Quack
Zoologie :	O.Pflugfelder